



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: Jose Manuel Andreu Morales
Serial No.: 10/761,150 Examiner: Fetterolf, B. J.
Filed: January 20, 2004 Art Unit: 1642
For: Method of detecting and analysing paclitaxel-mimetic compounds.

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

DECLARATION UNDER 37 C.F.R. § 1.132

Sir:

1. I, José Manuel Andreu, PhD, staff scientist of the CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS, CSIC, since 1981, declare and state as follows:

I am currently employed as Research Professor and head of my laboratory at the CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS, CSIC, at RAMIRO DE MAEZTU 9, 28040 MADRID, Spain.

My professional qualifications are as described in my *Curriculum Vitae* attached as Exhibit A. I received a Ph.D. degree in Biology from the University of Madrid UCM in 1976. I was a postdoctoral fellow at the Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham MA where I performed research in the field of Physical Biochemistry of tubulin interactions with antimetabolic drugs, from 1978 to 1981.

2. I, José Fernando Díaz, PhD, staff scientist of the CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS, CSIC, since 2001, declare and state as follows:

I am currently employed as staff scientist at the CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS, CSIC, at RAMIRO DE MAEZTU 9, 28040 MADRID, Spain.

My professional qualifications are as described in my *Curriculum Vitae* attached as Exhibit B. I received a Ph.D. degree in Biology from the University of Madrid UCM in 1993. I was a postdoctoral fellow at the Catholic University of Leuven, Department of Chemistry, Leuven. Belgium MA where I performed research in the field of Physical Biochemistry of the structural activation mechanisms of the oncogene product Ha-ras-p21, from 1994 to 1999.



3. The above-referenced patent application describes microtubules used as a material of the invention. The following experimental data describes the remaining Flutax-2 binding sites for a 50 μM solution of fresh prepared binding sites in the cross-linked microtubules of the present invention, in relation to the remaining Flutax-2 binding sites for a 50 μM solution of fresh prepared binding sites in the cross-linked microtubules of Díaz *et al.* "Molecular Recognition of Taxol by Microtubules", J. of Biol. Chem. 2000, Vol.275, No.34.

A) We prepared microtubules as described by Díaz *et al.* 2000 and stored them at 25°C.

The concentration of binding sites was measured with the following procedure. A 1:20 dilution of the solution of microtubules was prepared to measure the total tubulin concentration of tubulin spectrophotometrically (extinction coefficient 107000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ at 275 nm, in 10 mM sodium phosphate buffer containing 1% SDS pH 7.0). Employing the previously determined concentration, we prepared 0.2, 0.5, 1, 2 and 5 μM solutions (tubulin concentration) of crosslinked microtubules in 10 mM sodium phosphate buffer containing 1% SDS pH 7.0 and in a mixture 4:1 of 10 mM sodium phosphate buffer containing 1% SDS pH 7.0 and GAB and measure their fluorescence intensity (λ_{exc} 280 nm λ_{ems} 323 nm) to get a fluorometric tubulin concentration calibration curve.

We prepared 0.2, 0.5, 1, 2 and 5 μM solutions of Flutax-2 in 10 mM sodium phosphate buffer containing 1% SDS pH 7.0 and in a mixture 4:1 of 10 mM sodium phosphate buffer containing 1% SDS pH 7.0 and GAB and measure their fluorescence intensity (λ_{exc} 495 nm λ_{ems} 520 nm) to get a fluorometric Flutax-2 concentration calibration curve.

We centrifuged in a Beckman TL100 rotor in Beckman TLX Optima ultracentrifuge at 50.000 rpm for 20 min at 25°C. 200 μl of the following samples in GAB: a. 20 μM , 10 μM , 5 μM and 2 μM crosslinked microtubules. b. 2 μM crosslinked microtubules plus 5 μM Flutax-2. c. 2 μM crosslinked microtubules plus 5 μM Flutax-2 plus 100 μM docetaxel.

We collected the supernatants and diluted them 1:4 in 10 mM sodium phosphate buffer containing 1% SDS pH 7.0. 200 μl of 10 mM sodium phosphate buffer containing 1% SDS pH 7.0 were added to the pellets to resuspend them and we diluted them 1:4 in 10 mM sodium phosphate buffer containing 1% SDS pH 7.0.

We took the dilutions of supernatants and pellets of the tubes containing only crosslinked microtubules (a) and measure the tubulin concentrations fluorometrically employing the appropriate calibration curves to know the percentage of tubulin polymerized, which was over 80%.

We took the dilutions of supernatants and pellets of the tubes containing crosslinked microtubules and Flutax-2 (b and c) and measured the Flutax-2 concentrations fluorometrically employing the appropriate calibration curves. The difference between the Flutax-1 concentration in tube b and c was considered the concentration of binding sites.

The following Table 1 provides the concentration of Flutax-2 binding sites remaining at the time intervals indicated.

Table 1	
<u>Time</u>	<u>Concentration of binding sites</u>
0 h.	50.0 μM
6 h.	47.3 μM
24 h.	39.7 μM
48 h.	30.5 μM
168 h.	7.4 μM



B) We prepared microtubules as described by Díaz et al. 2000 and stored the microtubules at 4°C. The concentration of binding sites was measured as described in point A).

The following Table 2 provides the concentration of Flutax-2 binding sites remaining at the time intervals indicated.

Table 2

<u>Time</u>	<u>Concentration of binding sites</u>
0 h.	50.0 μ M
6 h.	49.3 μ M
24 h.	48.3 μ M
48 h.	44.5 μ M
168 h.	33.2 μ M
720 h.	8.8 μ M

C) We prepared microtubules conserved the same as described in the present patent application. We stabilized the microtubules by means of chemical crosslinking and conserved the microtubules in liquid nitrogen following dialysis against a conservation and cryopreservation buffer. The concentration of binding sites was measured as described in Point A).

The following Table 3 provides the concentration of Flutax-2 binding sites remaining at the time intervals indicated.

Table 3

<u>Time</u>	<u>Concentration of binding sites</u>
0 h.	50.0 μ M
24 h.	49.5 μ M
48 h.	49.4 μ M
168 h.	50.6 μ M
720 h.	50.2 μ M
1 year	50.4 μ M

4. We further declare that all statements made herein of our own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the present application or any patent issuing thereon.

MADRID
(Place)

October 3, 2007
(Date)

Signature: J.M. Andreu

MADRID
(Place)

October 3, 2007
(Date)

Signature: J. F. Díaz

Curriculum Vitae

Name: José Fernando Díaz Pereira

Date of birth: September 9th 1965

Place of birth: El Ferrol (Spain)

Phone: 34-918373112 ext 4269

Fax: 32-915360432

E-mail: fer@cib.csic.es

Address: Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Ramiro de Maeztu, 9
28040, Madrid
España

Education

Universidad Complutense de Madrid, (Ms. Sci. in Chemistry, 1988)

Universidad Complutense de Madrid (Small thesis in Chemistry, 1989), Title
"Complete reaction scheme of the tubulin colchicine interaction "

Universidad Complutense de Madrid (Ph. D. In Chemistry, 1993), Title "Ligand
induced protein assembly: Tubulin polymerization into microtubules coupled to the
binding of taxoids"

Languages:

English, Spanish, Dutch and Portuguese
Basic skill of German and French.

Education experience

Lecturer in the following courses

- "Protein structure" Biochemistry doctoral program of the Universidad Complutense of Madrid, academic years 1990-91, 1991-92 and 1992-1993.
- "Nucleic acid structure" Biochemistry doctoral program of the Universidad Complutense of Madrid, academic years 1990-91, 1991-92 and 1992-1993.
- "Dynamics and Function of Cytoskeleton" Biochemistry doctoral program of the Universidad Autonoma de Madrid academic year 1992-1993.
- "Molecular modeling" Chemistry and biochemistry doctoral program of the Katholieke Universiteit Leuven, academic year 1995-1996.
- "Analytical and structural biophysics" Chemistry and biochemistry doctoral program of the Katholieke Universiteit Leuven, academic year 1996-1997 and 1997-1998.
- EMBO Practical Course on Solution Scattering from Biological Macromolecules. Hamburg September 2001
- Master de Bioinformática master of Universidad Complutense de Madrid Academic year 2002-2003, 2003-2004, 2004-2005, 2005-2006 and 2006-2007.
- Theoretical and Practical Proteomics, Centro Nacional Investigaciones Cardiovasculares, January 2007.
- **Programa de doctorado de calidad "Estructura y Función de proteínas".** Programa interuniversitario de doctorado. Universidad de Sevilla, Universidad de Zaragoza, Universidad Autónoma de Barcelona, CSIC. Mención de Calidad 2005-2007. Madrid, 12-16 febrero 2007

Master Thesis Directed:

- Filip Buyse, Katholieke Universiteit Leuven, academic year 1996-1997, "Molecular dynamics of the Y32W mutant of Ha-ras-p21 in its GDP- and GTP bound forms".
- Steven Keupens, Katholieke Universiteit Leuven, academic year 1997-1998, "Characterization of the hinges of the effector loop in the reaction pathway of activation of ras-proteins. Kinetics of binding of beryllium trifluoride to V29G and I36G Ha-ras-p21.". **Best master thesis of the academic year 1997-1998 of the faculty of Chemistry, Katholieke Universiteit Leuven**
- Gert Vervliet, Katholieke Universiteit Leuven, academic year 1997-1998 "The effect of high pressure in the conformation stability of proteins as studied by molecular dynamics and FTIR spectroscopy".

Research experience

Research positions held:

-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Centro de Investigaciones Biológicas, Predoctoral Trainee 1989-1993.

-LCBD, K.U. Leuven, Postdoctoral fellow, 1994-1997.

-LCBD, K.U. Leuven, Associated researcher, 1997-1998.

-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Centro de Investigaciones Biológicas, Associated researcher, 1998-2001.

-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Centro de Investigaciones Biológicas, Staff scientist, 2001-.

Fellowships:

-Fellowship Plan Nacional de Formación de Personal Investigador from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain 1989-1993.

-Fellowship from the British Council: Interchange of young researchers between United Kingdom and Spain 1989.

-Fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain: Use of large facilities 1989, 1990.

-Postdoctoral fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain, 1994-1995.

-Junior fellow from the K.U. Leuven research council. 1996-1997.

Publications:

1.-Díaz, J.F. and Andreu, J.M.

Kinetics of dissociation of the tubulin-colchicine complex
J. Biol. Chem. 266, 2890-2896. (1991)

2.-Andreu, J.M., García de Ancos, J., Medrano, F.J., Gil, R., Díaz, J.F., Nogales, E., Towns-Andrews, E., Pantos, E. and Bordas, J.

Twelve protofilament taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin. A synchrotron X-ray scattering study in comparison with glycerol- and Map-induced microtubules.

Amer. Inst. Phys. Monographs. 227, 160-169. (1991)

- 3.-Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., Garcia de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E. and Towns-Andrews, E.
Low resolution structure of microtubules in solution
J. Mol. Biol. 226, 169-184. (1992)
- 4.-Díaz, J.F. and Andreu, J.M.
Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere.
Reversibility, ligand stoichiometry and competition
Biochemistry, 32, 2747-2755. (1993)
- 5.-Díaz, J.F., Menendez, M. and Andreu, J.M.
Thermodynamics of ligand-induced assembly of tubulin
Biochemistry, 32, 10067-10077.(1993)
- 6.-Díaz, J.F., Pantos, E., Bordas, J. and Andreu, J.M.
Solution structure of GDP-tubulin double rings to 3 nm resolution and comparison with microtubules
J. Mol. Biol. 238, 214-225. (1994)
- 7.-Andreu, J.M., Díaz, J.F., Gil, R., de Pereda, J.M., García, M., Peyrot, V., Briand, C., Towns-Andrews, E. and Bordas, J.
Solution structure of microtubules induced by the side chain taxol analogue taxotere to 3 nm resolution.
J.Biol.Chem. 269, 31785-31792. (1994)
- 8.-Díaz, J.F., Wroblowski, B. and Engelborghs, Y.
Molecular dynamics simulation of the solution structures of Ha-ras-p21 GDP and GTP complexes: Flexibility; possible hinges and levers of the conformational transition
Biochemistry 34,12038-12047. (1995)
- 9.-Encinas, M.V., Olsen, L.R., Díaz, J.F. Frey, P.A., Reed, G., Andreu, J.M. Goldie, H. and Cardemil, E.
Circular dichroism and Fourier transform Infrared spectroscopic studies on the secondary structure of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* Phosphoenolpyruvate Carboxykinases
Biochim. Biophys. Acta. Protein Struct. Mol. Enzymol. 1252(1),23-27. (1995)
- 10.-Bastyns, K, Froeyen, M., Díaz, J.F., Volckaert, G. and Engelborghs, Y.
Experimental and theoretical study of electrostatic effects on the Isoelectric pH and the pK_a of the catalytic residue His-102 of the Recombinant ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (Barnase)
Proteins:Structure, function and genetics 24,370-378 (1996)
- 11.-Díaz, J.F., Andreu, J.M., Diakun, G., Towns-Andrews, E., Nogales, E. and Bordas, J. Structural intermediates in the assembly pathways of taxoid-induced microtubules and GDP-tubulin double ring detected by time-resolved X-ray scattering.

Biophys. J. 70,2408-2420 (1996)

12.-Wroblowski, B., Díaz, J.F., Heremans, K. and Engelborghs, Y.
Molecular mechanisms of pressure induced conformational changes in BPTI
Proteins: Struct., Funct. and Genet., 25,446-455 (1996)

13.-Díaz, J.F., Wroblowski, B., Schlitter, J. and Engelborghs, Y.
Calculation of pathways for the conformational transition between the GDP and GTP bound states of the Ha-ras-p21 protein
Proteins: Struct., Funct. and Genet. 28,434-451 (1997)

14.-Lambeir, A.M., Díaz, J.F., Chacón, P., Vermeulen, G. Devreese, B and Scharpe, S.
A prediction of DPP IV/ CD26 domain structure from a physicochemical investigation of dipeptidyl peptidase IV (CD26) from human seminal plasma
Biochem. Biophys. Acta. Protein Struct. Mol. Enzymol. 1340,215-226. (1997)

15.-Díaz, J.F., Sillen, A. and Engelborghs, Y.
An Equilibrium and kinetic study of the conformational transition towards the active state of Ha-ras-p21, induced by the binding of BeF_3^- to the GDP-bound state, in the absence of GAPs
J. Biol. Chem. 272,23138-23143. (1997)

16.-Wroblowski, B., Díaz, J.F., Heremans, K. and Engelborghs, Y.
Pressure induced conformational changes in BPTI as seen by molecular dynamics simulations.
High pressure research in the biosciences and biotechnology, 155-158. (1997) K. Heremans (Ed.). Leuven University Press, Lovaina, Bélgica.

17.-Wroblowsky, B., Díaz, J.F., Schlitter, J. and Engelborghs, Y.
Modelling pathways of a conformational transition in α -Chymotrypsin"
Protein Eng. 10(10),1163-1174. (1997)

18.-Díaz, J.F., Strobbe, R., Engelborghs, Y, Chacón, P., Andreu, J.M. and Diakun, G.
Fast mixing device for time-resolved synchrotron x-ray scattering studies of radiation sensitive proteins.
Rev. Sci. Instr. 69(1), 286-289. (1998)

19.-Menéndez, M., Rivas, G. Díaz, J.F., and Andreu, J.M.
Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high affinity site bound magnesium ion at nucleotide N-site.
J. Biol. Chem. 273(1), 167-176. (1998)

20.-Bras, W., Diakun, G., Díaz, J.F., Maret, G., Kramer, H., Bordas, J. and Medrano, J.F.
The susceptibility of pure tubulin to high magnetic fields: A magnetic birefringence and X-ray fibre diffraction study.

Biophys. J. 74,1509-1521. (1998)

21.-Chacón, P., Morán, F., Díaz, J.F., Pantos, E. and Andreu, J.M.
Low resolution structure of proteins in solution deduced from X-ray scattering with a genetic algorithm.

Biophys. J. 74,2760-2775. (1998)

22.-Díaz, J.F., Valpuesta, J.M., Chacón, P. Diakun, G. and Andreu, J.M
Changes in protofilament number induced by taxol binding to an easily accessible site: internal microtubule dynamics.

J. Biol. Chem. 273,33803-33810. (1998)

23.-Bras, W., Diakun, G.P., Denny, R.C., Gleeson, A., Ferrero, C., Levine, Y.K. and Díaz, J.F.

Microtubule biopolymers: fibre diffraction and effects of interparticle scattering.
Fibre Diffraction Reviews. 7, 31-36. (1998)

24.-Kuppens, S., Díaz, J.F. and Engelborghs, Y.

Characterization of the hinges of the effector loop in the reaction pathway of activation of ras-proteins. Kinetics of binding of beryllium trifluoride to V29G and I36G Ha-ras-p21.

Prot. Sci. 8(9) 1860-1866 (1999)

25.-Sillen, A., Díaz, J.F. and Engelborghs, Y.

A step towards the prediction of the fluorescence lifetimes of tryptophan residues in proteins based on structural data.

Prot. Sci. 9(1) 158-169 (2000)

26.-Díaz, J.F., Escalona, M.M., Kuppens, S. and Engelborghs, Y.

Role of the switch II region in the conformational transition of activation of Ha-ras-p21.

Prot. Sci. 9(2) 361-368 (2000)

27.-Cadot, P., Díaz, J.F., Proost, P., Van Damme, J., Engelborghs, Y. Stevens, E.A.M., and Ceuppens, J.L.

Purification and Characterization of Bet v9, an 18-kDa allergen of birch (*Betula verrucosa*) pollen. Identification as a cyclophilin.

J. Allergy. Clin. Immunol.10(2) 286-291 (2000)

28.-Bras, W., Diakun, G.P., Denny, R.C., Gleeson, A., Ferrero, C., Levine, Y.K. and Díaz, J.F.

Scattering from magnetically oriented microtubule biopolymers.

Scattering from polymers: Characterization by X-rays, neutrons and light scattering.
ACS series Ed.Oxford University Press 341-353 (2000)

29.-Bras, W., Diakun, G.P., Denny, R.C., Ferrero, C., Levine, Y.K. and Díaz, J.F.

Scattering from biopolymers with helical symmetry in solution
J. Appl. Cryst. (33) 659-663 (2000)

30.-Chacón, P., Díaz, J.F., Morán, F. and Andreu, J.M.
Reconstruction of protein form with X-ray solution scattering and a genetic algorithm
J. Mol. Biol. (299) 1289-1302 (2000)

31.-Díaz, J.F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A.A. and Andreu, J.M.
Molecular recognition of taxol by microtubules: Kinetics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site.
J. Biol Chem. (275) 26265-26276 (2000)

32.-Díaz, J.F., Kralicek, A., Mingorance, J., Palacios, J.M., Vicente, M. and Andreu, J.M.
Activation of cell division protein FtsZ: Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide γ -phosphate.
J. Biol. Chem. (276) 17307-17315 (2001)

33.-Pryor, D.E., O'Brate, A., Bilcer, G., Díaz, J.F., Wang, Y., Wang, Y., Kabaki, M, Jung, M.K., Andreu, J.M., Gosh, A.K., Giannakakou, P. and Hamel, E
The microtubule stabilizing agent Laulimalide does not bind in the taxoid site, kills cells resistant to Paclitaxel and Epothilones, and may not require its epoxide moiety for activity.
Biochemistry (41) 9109-9115 (2002)

34.-Nicolau, K.C., Ritzén, A, Namoto, K, Buey, R.M., Díaz, J.F., Andreu, J.M., Wartmann, M., Altmann, K.H., O'Brate, A. and Giannakakou, P.
Chemical synthesis and biological evaluation of novel epothilone B and trans-12,13-cyclopropyl epothilone B analogs
Tetrahedron (58) 6413-6432 (2002)

35.-Díaz, J.F., Barasoain, I. and Andreu, J.M.
Fast Kinetics of taxol binding to microtubules. Effects of solution variables and microtubule-associated proteins.
J. Biol. Chem. (278) 8407-8419 (2003).

36.-Buey, R.M., Díaz, J.M., Andreu, J.M., O'Brate, A., Giannakakou, P. Nicolaou, K.C., Sasmal, P.K. Ritzen, A. y Namoto, K.
Energetics of interaction of C12, cyclopropyl and C15 side chain epothilone analogs with the paclitaxel binding site. Relationship between binding affinity, microtubule stabilization and cytotoxicity
Chem. Biol. (11) 225-236 (2004)

37.-Gaitanos, T.N., Buey, R.M., Díaz, J.F., Northcote, P.T., Teesdale-Spittle, P. Andreu, J.M., and Miller, J.H.
Peloruside A does not bind to the taxoid site on β -tubulin and retains its activity in multidrug resistant cell lines.

Cancer Research, (64), 5063-5067. (2004)

38.-Díaz, J.F., Barasoain, I., Souto, A.A., Amat-Guerri, F. and Andreu, J.M.
Macromolecular accessibility of fluorescent taxoids bound at a paclitaxel binding site in the microtubule surface. *J. Biol. Chem.* (280), 3928-3937. (2005)

39.- Paterson, I, Menche, D, Håkansson, A.E., Longstaff, A., Wong, D., Barasoain, I., Buey, R.M. and Díaz. J.F.
Design, synthesis and biological evaluation of novel, simplified analogues of laulimalide: modification of the side chain. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 15 (9) 2243-2247 (2005)

40.-Edler, M.C., Buey, R.M., Gussio, R., Marcus, A.I., VanderWal, C.D., Sorensen, E.J., Díaz, J.F., Giannakakou, P., and Hamel., E.
Cyclostreptin (FR182877), an Antitumour Tubulin-Polymerizing Agent Deficient in Enhancing Tubulin Assembly Despite Its High Affinity for the Taxoid Site
Biochemistry 44, 11525-11538 (2005)

41.-Buey R.M., Barasoain, I., Jackson, M., Meyer, A., Giannakakou, P. Paterson, I., Mooberry, S. Andreu, J.M. and J. Fernando Díaz
Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: Thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity.
Chem. Biol 12, 1269-1279 (2005)

42.- Buey, R.M., Díaz, J.F. and Andreu, J.M.
The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: A polymerization-driven structural change.
Biochemistry 45, 5933-5938. (2006)

43.- Jiménez-Barbero, J., Canales, A., Northcote, P.T., Buey, R.M., Andreu, J.M. and Díaz, J.F.
NMR determination of the bioactive conformation of Peloruside A bound to microtubules. *JACS* 128, 8757-8765 (2006)

44.- Marcus, A.I., O' Brate, A.M., Buey, R.M., Zhou, J., Thomas, S., Khuri, F.R., Andreu, J.M., Díaz, J.F. and Giannakakou, P.
Farnesyl transferase inhibitors reverse taxane-resistance.
Cancer Research 66,8838-8846 (2006)

45.-Buey, R.M., Monterroso, B. Menéndez, M., Diakun, G., Chacón, P., Hermoso, J.A. and Díaz, J.F. Insights into molecular plasticity of choline binding proteins (pneumococcal surface proteins) by SAXS.
J. Mol. Biol. 365, 411-424 (2007)

46.- Buey, R. M., Calvo, E., Barasoain, I., Pineda, O., Edler, M. C., Matesanz, R., Cerezo, G., Vanderwal, C.D. Day, B.W., Sorensen, E.J., López, J.A., Andreu, J.M., Hamel, E. and Díaz, J.F. Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and

lumenal taxoid binding sites.

Nature Chem. Biol. 3, 117-125 (2007)

47.- Yang, C.G., Barasoain, I., Li, X., Matesanz, R., Liu, R., Sharom, F.J., Yin, D.L., Díaz, J.F. and Fang, W.S Overcoming Tumor Drug Resistance Mediated by P-glycoprotein Overexpression and β -Tubulin Mutations with High Affinity Taxanes: A Structure Activity Relationship Study of C-2 Modified 7-Acyl-10-Deacetyl Cephalomannines .

Chem. Med. Chem. 2, 691-701. (2007)

48.- Wang, L, Alcaraz, A.A., Matesanz, R. , Yang, C.G., Barasoain, I., Díaz, J.F., Li, Y.Z, Snyder, J.P. and Fang, W.S Synthesis, biological evaluation and tubulin binding poses of C-2 α sulfur linked taxol analogues.

Bioorg. Med. Chem. Let. 17 3191-3194 (2007)

49.-García-Fortanet, J., Murga, J., Carda, M., Marco., J.A., Matesanz, R., Díaz, J.F. and Barasoain I. The total synthesis and biological properties of the cytotoxic macrolida FD-891 and its non-natural (Z)-C12 Isomer.

Chem Eur. J. 13 5060-5074 (2007)

50.- Díaz, J.F. and Martínez-Buey, R

Characterizing Ligand-Microtubule Binding by competition methods

Microtubule Protocols (En prensa) (2007)

The Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA.

51.-La Regina, G., Edler,M.C., Brancale, A., Kandil,S., Piscitelli, F., Hamel, E. De Martino,G., Matesanz,R., Díaz,J.F., Scovassi, A.I., Prosperi, E., Lavecchia,A., Novellino,E., Artico, M. and Silvestri, R. New Arythioindoles Inhibitors of Tubulin Polymerization. 3. Biological Evaluation, SAR and Molecular Modeling Studies J. Med. Chem (En prensa). 2007

Congress communications:

-Díaz, J.F. and Andreu, J.M. (1989). Congreso Iberoamericano de Biofísica, Sevilla, Spain, "Esquema de reacción completo de la interacción tubulina-colchicina: Cinética de disociación del complejo".

-Barasoain, I., de Ines, C., Díaz, J.F., Andreu, J.M., Peirot, V., Leynadier, D., Garcia, P., and Briand, C. (1991). American Association for Cancer Research Meeting, Huston, USA. "Interaction of tubulin and cellular microtubules with Taxotere (RP 56976), a new semisynthetic analog of taxol".

-Díaz, J.F., Peyrot, V. and Andreu, J.M. (1991) IV Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular, Madrid, Spain, "Ensamblaje de tubulina inducido por taxol y su análogo RP 56976, un promotor mas potente del ensamblaje de microtúbulos".

-Díaz, J.F., Peyrot, V. and Andreu, J.M. (1991) III Congreso de la Sociedad Española de Biofísica, Madrid, Spain, "Ensamblaje de tubulina inducido por taxol y su análogo RP 56976, un promotor mas potente de la polimerización de microtúbulos".

-Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., Garcia de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E. and Towns-Andrews, E. (1991) III Congreso de la Sociedad Española de Biofísica, Madrid, Spain, "Estructura a baja resolución de los microtúbulos en solución. Dispersión de rayos X de sincrotrón y microscopía electrónica de microtúbulos de tubulina purificada inducidos por taxol en comparación con microtúbulos inducidos por glicerol y por MAPS".

-Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., Garcia de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E. and Towns-Andrews, E. (1992) Biophysical Society Annual Meeting, Houston, USA, "The low resolution structure of microtubules in solution: Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol induced microtubules". Biophysical Journal 61, 2, 2, A27.

-Peyrot, V., Briand, C., Díaz, J.F. and Andreu, J.M. (1992) II Interface of clinical and laboratory responses to anticancer drugs: Drugs and microtubules, Marseille, France "Biophysical characterization of the assembly of purified tubulin induced by taxol and taxotere (RP 56976)". Maimonide, 1, S22.

-Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., Garcia de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E. and Towns-Andrews, E. (1992) II Interface of clinical and laboratory responses to anticancer drugs: Drugs and microtubules, Marseille, France "The low resolution structure of microtubules in solution: Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol induced microtubules". Maimonide, 1, S24.

-Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., Garcia de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E. and Towns-Andrews, E. (1992) International Symposium on Cytoskeleton in Cell Function. Madrid, Spain, "The low resolution structure of microtubules in solution: Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol induced microtubules".

-Díaz, J.F., Peyrot, V., Briand, C. and Andreu, J.M. (1992) 5th International Congress on Cell Biology, Madrid, Spain, "Microtubule assembly reaction induced by taxol and taxotere (RP 56976)".

-Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., Garcia de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E. and Towns-Andrews, E. (1992) 5th International Congress on Cell Biology. Madrid, Spain, "The low resolution structure of microtubules in

solution: Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol induced microtubules".

-Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., García de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E. and Towns-Andrews, E. (1992) European congress of electron microscopy. Granada, Spain, "Twelve protofilaments taxol-induced microtubules observed by X-ray solution scattering and cryo-electron microscopy".

-Díaz, J.F., and Andreu, J.M. (1993) Research conference on Biophysics of the Cytoskeleton, Marseille, France. "Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: Ligand stoichiometry and competition"

-Díaz, J.F., Andreu, J.M., Bordas, J., Towns-Andrews E. (1993) Research Conference on Biophysics of the Cytoskeleton, Marseille, France, "Time-Resolved X-ray scattering of ligand-induced microtubule assembly shows intermediate structures"

-Díaz, J.F., Andreu, J.M., Bordas, J., and Towns-Andrews E. (1993) 11th International Biophysics Congress Budapest, Hungary "Time-Resolved X-ray scattering of ligand induced microtubule assembly shows intermediate structures"

-Andreu, J.M. and Díaz, J.F. (1993) Synchrotron radiation in Biological and Medical sciences, Espinho Portugal, "Solution structure and assembly of microtubules and tubulin rings to 3 nm resolution".

-Díaz, J.F. and Andreu, J.M. (1993) Synchrotron radiation in Biological and Medical sciences, Espinho Portugal, "Time-Resolved X-ray scattering of ligand induced microtubule assembly shows intermediate structures"

-Wroblowsky, B., Díaz, J.F., Schlitter, J. and Engelborghs, Y. (1995) Research conference on protein folding and stability, San Feliu de Guixols, Spain "Modelling pathways of a conformational transition in ∇ -Chymotrypsin"

-Díaz, J.F., Wroblowski, B. and Engelborghs, Y. (1995) First European Symposium of the protein society. Davos, Switzerland, "Molecular dynamics simulation of the solution structures of Ha-ras-p21 GDP and GTP complexes: Flexibility, possible Hinges and Levers of the conformational transition."

-Wroblowsky, B., Díaz, J.F., Schlitter, J. and Engelborghs, Y. (1995) First European Symposium of the protein society. Davos, Switzerland "Modelling pathways of a conformational transition in ∇ -Chymotrypsin"

-Chacón, P. Morán, F, Montero, F, Díaz, J.F., Pantos, E. and Andreu, J.M. (1995) ECAL Madrid, Spain, "Genetic algorithms in low resolution structure of proteins"

-Jacoby, E., Krüger, P., Wollmer, A., Wroblowski, B. Díaz, J.F., Engelborghs, Y. and Schlitter J., (1995) International Conference on molecular structural biology, Vienna, Austria, "Comparison of molecular dynamics and energy minimization techniques for pathway determination".

-Díaz, J.F., Brass, W., Diakun, G., Dumortier, C, Engelborghs, Y. and Kramer H. (1995) Research conference on Biophysics of cytoskeleton. San Feliu de Guixols, Spain, "Alignment of microtubules in high magnetic fields"

-Wroblowski, B., Díaz, J.F., Heremans, K., and Engelborghs, Y. (1996). High pressure bio-science and bio-technology. Leuven, Belgium. "Molecular Dynamics simulation of pressure induced conformational changes in BPTI"

-Díaz, J.F., Brass, W., Diakun, G., Dumortier, C., Engelborghs, Y. and Kramer H. (1996) Dubble, prospective users meeting. Eindhoven, The Netherlands "Alignment of microtubules in high magnetic fields"

-Díaz J. F., Wroblowski B. , Schlitter, J. and Engelborghs, Y. (1997) Second European Symposium of the Protein Society. Cambridge, U.K.. "Calculation with explicit solvent simulation of pathways for the conformational transition between the GTP and GDP bound states of the Ha-ras-p21 protein".

-Díaz J. F., Wroblowski B. , Schlitter, J. and Engelborghs, Y. (1997) European Biophysical Meeting. Orleans, France. "Calculation with explicit solvent simulation of pathways for the conformational transition between the GTP and GDP bound states of the Ha-ras-p21 protein".

-Díaz, J.F., Keupens, S., and Engelborgs, Y. (1998) Congreso de la Sociedad Española de Biofísica, Madrid, Spain. Characterization of the hinges of the effector loop in the reaction pathway of activation of ras-proteins. Kinetics of binding of beryllium trifluoride to V29G and I36G Ha-ras-p21.

Díaz, J.F. and Andreu. J.M. (1999) III Simposio de la Red española de Proteínas Guardamar del Segura, Spain "Mecanismo de reconocimiento molecular de taxol. Cinética de unión de taxoides fluorescentes a microtúbulos".

-Chacón, P., Díaz, J.F., and Andreu, J.M. (1999) Shape determination of biological Macromolecules in Solution and Related topics. Hamburg, Germany.

-Buey, R.M., Díaz, J.F., Barasoain, I and Andreu, J.M. Energetics of interaction of C12, cyclopropyl and C15 side chain epothilone analogs with the paclitaxel binding site. Relationship between binding affinity, microtubule stabilization and cytotoxicity 48th Biophysical Society annual meeting
Baltimore, Estados Unidos, 2004

-Weishuo Fang and J. Fernando Diaz
Synthesis and Effects of Semisynthetic Taxoids against Drug Resistant Tumors at Molecular Level
FEBS summer school: Chemistry meets Biology.
Spetses, Greece, 2005

Invited lectures:

-Tubulin assembly induced by taxoids. Universidad de Aix en Provence, Marseille, France, 1992.

-Calculated pathways of the conformational change associated with nucleotide hydrolysis of the oncogenic protein Ha-ras-p21. Symposium "Onderzoekers kijken naar eiwitstructuren en nucleïnezuuren".Heverlee Belgium. 1995.

-Calculation of pathways for the conformational transition between the GDP and GTP bound states of the Ha-ras-p21 protein. Calculations with explicit solvent simulations and comparison with calculations in vacuum. Conference "G-protein coupled receptors: Structure and Function". Antwerp, Belgium 1996

-Use of Targeted Molecular Dynamics algorithm for the simulation of conformational pathways of Ha-ras-p21. Universidad del Ruhr, Bochum, Germany, 1997.

-Activation of Ha-ras-p21 induced by phosphate analogs. Centre National de la Recherche Scientifique. Gif sur l'Yvette France, 1997

-Del ordenador al tubo de ensayo. Caminos estructurales de activación de Ha-ras-p21. XXV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. León Spain, 2002

-Fast kinetics of taxol binding to an exposed binding site in microtubules
48th Biophysical Society annual meeting
Baltimore, Estados Unidos 2004

Autores: Weishuo Fang and J. Fernando Díaz

Título: Synthesis and Effects of Semisynthetic Taxoids against Drug Resistant Tumors at Molecular Level

Tipo de participación: Poster

Congreso:FEBS summer school: Chemistry meets Biology.

Publicación:

Lugar celebración: Spetses, Greece Fecha: 2005

Autores: Rubén M. Buey, Enrique Calvo, Isabel Barasoain, Oriol Pineda, Michael C. Edler, Ruth Matesanz, Gemma Cerezo, Christopher D. Vanderwal, Billy W. Day, Erik J. Sorensen, Juan Antonio López, José Manuel Andreu, Ernest Hamel, y J. Fernando Díaz

Título: LA INTERACCION COVALENTE DE CICLOESTREPTINA CON LA b-TUBULINA MARCA EL CAMINO DE ENTRADA DEL TAXOL A LOS MICROTUBULOS.

Tipo de participación: Presentación Oral

Congreso: Reunión de la red temática "Estructura y Función de Proteínas"

Publicación:

Lugar celebración: Bilbao, España Fecha: 2006

Autores: Ruth Matesanz, Isabel Barasoain, Frances J. Sharom, José Manuel Andreu, Weishuo Fang, y J. Fernando Díaz

Título: Termodinámica de la interacción proteína-ligando aplicada a la optimización de fármacos. Modulación de la afinidad de los taxoides por su sitio en la tubulina como estrategia para vencer la resistencia múltiple a drogas.

Tipo de participación: Presentación Oral

Congreso: Reunión de la red temática "Estructura y Función de Proteínas"

Publicación:

Lugar celebración: Bilbao, España Fecha: 2006

Autores: Rubén M. Buey, Sonia Huecas, J. Fernando Díaz y José Manuel Andreu.

Título: The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a conserved polymerization driven structural change.

Tipo de participación: Presentación Oral

Congreso: Reunión de la red temática "Estructura y Función de Proteínas"

Publicación:

Lugar celebración: Bilbao, España Fecha: 2006

Autores: Rubén M. Buey, Enrique Calvo, Isabel Barasoain, Oriol Pineda, Michael C. Edler, Ruth Matesanz, Gemma Cerezo, Christopher D. Vanderwal, Billy W. Day, Erik J. Sorensen, Juan Antonio López, José Manuel Andreu, Ernest Hamel, y J. Fernando Díaz

Título: A chemical proteomics approach reveals the taxoid binding to microtubules.

Tipo de participación: Presentación Oral

Congreso: 7th Proteomics Meeting

Publicación:

Lugar celebración: Siena, Italia Fecha: 2006

Use of large facilities:

- Synchrotron of the Science and Engineering Research Council, Daresbury, UK.
- Several supercomputers.
- Circular dichroism devices.
- High magnetic fields (30 Tesla) in the European High magnetic field facility.

Experience in the following techniques:

-Fluorescence, circular dichroism, absorption and differential absorption spectrophotometry, centrifugation, chromatography, synchrotron X-ray scattering, automatic calculation and data processing, protein purification, use of radioactive samples, electron microscopy, electrophoresis and western blot.

Computing:

-Hardware and software of the PC-compatible system.

-Languages: Basic, Fortran and C.

-Operative system: VMS, DOS, Unix and CMS.

-Expertise in communications: serial, X25, Decnet, TCPIP and NFS.

-System Manager between 1990-1993 of the Unix system of Centro de Investigaciones Biológicas, model Stardent 3020.

-Expertise in the Hardware of the Stardent system and Silicon Graphics

-Expertise in security of the Unix systems.

-Large expertise in computer simulations, with the use of Otoko, Lego and Dalai packages for the simulation of X-ray scattering data, and with the use of Gromos and Charmm for Molecular Dynamics simulations.

José Manuel Andreu
Research Professor, CSIC Spain

C.V. 2007

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid.
E-mail: j.m.andreu@cib.csic.es
http://www.cib.csic.es/tubulinas
phone: (34) 918373112, extensions 4381, 4380.
fax: (34) 915360432.

Birth date: June 17 1949, Valencia, Spain. Married, two sons.
MSc Biology (Biochemistry) 1972, Universidad Complutense de Madrid.
PhD Biochemistry 1976, Universidad Complutense de Madrid (honors).
Languages: Spanish, English, basic French.

RESEARCH INTERESTS include Protein Assembly, Structure and Interactions, Cytoskeleton. Current Research focuses on the tubulin family of polymerizing GTPases, including eukaryotic tubulin, cell division protein FtsZ and bacterial tubulin, and the modulation of their assembly.

Expertise: biochemical and biophysical methods, including protein-protein and protein-ligand interactions, fluorescence, circular dichroism, synchrotron X-ray scattering, hydrodynamics, sequence specific antibodies, and limited proteolysis.

RESEARCH CAREER

Group leader since 1983 at Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Spain. CSIC staff Research Associate 1981-87, Research Scientist 1987-93, Research Professor 1993-

Synchrotron Radiation user (principal investigator), Daresbury Laboratory, UK. 1988-94
Senior visiting scientist, Department of Biochemistry, Brandeis University, 1985.

Research associate (USA-Spain Joint Committee fellow) and Fogarty International postdoctoral fellow at the Department of Biochemistry, Brandeis University, MA, USA, 1978-1981, in the laboratory of Prof. S.N. Timasheff. Research subject: Interactions of tubulin with antimetabolic drugs (Physical Biochemistry).

Postdoctoral fellow (Fundación March) and research associate (CSIC) at Centro de Investigaciones Biológicas, 1976-78. Visiting scientist (EMBO fellow) at Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, FRG, 1976, Prof. O. Luderitz's laboratory. Subject: glycoprotein analysis.

MSc and PhD Research Fellow at Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) 1971-1976. PhD advisor: Dr. E. Muñoz. Research subject: structure and function of membrane bound coupling factor 1 (ATPase) of oxidative phosphorylation.

Research grants as principal investigator include : USA-Spain Joint Committee for Scientific and Technological Cooperation (1985-1988). CAICYT/CSIC (1985-1988). SERC Synchrotron Radiation Facility Committee (UK) beam time awards SP01, SP05 (1988-1991). DGICYT (1988-1993). Spanish-French Joint Actions (1988, 1990-92, 1995). EC Science Program contract SC1-CT91-0658 (1992-1994). DGICYT (1993-96), DGES (1996-99). Fundación Científica, Asociación Española contra el Cáncer (1996-98), CAM (2000), CICYT (2000-2003), MCYT (2003-2005) MEC(2006-2008).

Member of the Spanish societies of Biophysics, Biochemistry and Cell Biology, European Cytoskeletal Forum, SERC Biological Sciences Synchrotron ESS, UK (1993-94), the selection panel for the appointment or research director, ESRF, Grenoble (1996). Co-organizer of several international meetings, chairman of the 1995 European Science Foundation meeting Biophysics of Cytoskeleton.

Has reviewed grant proposals for ANEP, HFSP, NSF, NATO, ISF, FONDECYT. Reviewer of manuscripts for Biochemistry, J. Biol. Chem., J. Mol. Biol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, FEBS Lett., Arch. Biochem. Biophys., Biol. Cell, Eur. J. Biophys., Intl. J. Cancer, Nanotechnology, Chemistry and Biology.

PUBLICATIONS. Author of some 130 scientific papers, 35 invited presentations at international meetings, 2 patents. Representative publications include the following:

-Andreu, J.M. & Muñoz, E. (1979). Molecular properties of random coil and refolded forms of α and β subunits of an energy-transducing ATPase from bacterial membranes.
Biochemistry, 18, 1836-1844.

- Andreu, J.M. & Timasheff, S.N. (1982) Interaction of tubulin with single ring analogues of colchicine. **Biochemistry**, **21**, 534-543.
- Andreu, J.M. & Timasheff, S.N. (1982) Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **79**, 6753-6756.
- Andreu, J.M. (1982) Interaction of tubulin with non-denaturing amphiphiles. **EMBO Journal** **1**, 1105-1110.
- Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J., Lee, J.C. & Timasheff, S.N. (1984) Interaction of tubulin with bifunctional colchicine analogues: an equilibrium study. **Biochemistry** **23**, 1742-1752.
- Menendez, M., Laynez, J., Medrano, F.J. & Andreu, J.M. (1989). A thermodynamic study of the interaction of tubulin with colchicine site ligands. **J. Biol. Chem.** **264**, 16367-16371.
- Arévalo, M.A., Nieto, J.M., Andreu, D. & Andreu, J.M. (1990). Tubulin assembly probed with antibodies to synthetic peptides. **J. Mol. Biol.**, **214**, 105-120.
- Díaz, J.F. & Andreu, J.M. (1991) Kinetics of dissociation of the tubulin-colchicine complex. Complete reaction scheme and comparison to thermodynamic measurements. **J. Biol. Chem.**, **266**, 2890-2896.
- Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., García de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E. & Towns Andrews, E. (1992) Low resolution structure of microtubules in solution. Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin in comparison with glycerol- and Map-induced microtubules **J. Mol. Biol.**, **214**, 105-120.
- Díaz, J.F., Menendez, M. & Andreu, J.M. (1993) Thermodynamics of ligand-induced assembly of tubulin. **Biochemistry**, **32**, 10067-10077.
- Díaz, J.F., Pantos, E., Bordas, J. & Andreu, J.M. (1994) Solution structure of GDP-tubulin double rings to 3 nm resolution and comparison with microtubules, and García de la Torre, & Andreu, J.M. (1994) Hydrodynamic analysis of tubulin dimer and double rings **J. Mol. Biol.** **238**, 214-225.
- Souto, A.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., Barasoain, I., Abal, M. & Amat-Guerri, F. (1995) New fluorescent water-soluble taxol derivatives **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** **34**, 2710-2712.
- de Pereda, J.M., Leynadier, D., Evangelio, J., Chacón, P. & Andreu, J.M. (1996) Tubulin secondary structure analysis, limited proteolysis sites and homology to FtsZ **Biochemistry** **35**, 14203-14215.
- Chacón, P., Morán, F., Díaz, J.F., Pantos, E. & Andreu, J.M. (1998) Low resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm **Biophysical J.**, **74**, 2760-2775 & cover
- Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuña, A.U., Amat-Guerri, F. & Andreu, J.M. (1998) Fluorescent taxoids as probes of the microtubule cytoskeleton. **Cell Motil. Cytosk.** **39**, 73-90 & cover
- Menendez, M., Rivas, G., Díaz, J.F. & Andreu, J.M. (1998) Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high-affinity magnesium ion at nucleotide N-site **J. Biol. Chem.** **273**, 33803-33810.
- Díaz, J.F., Valpuesta, J.M., Chacón, P., Diakun, G. & Andreu, J.M. (1998) Changes in microtubule protofilament number induced by taxol binding to an easily accessible site: internal microtubule dynamics? **J. Biol. Chem.**, **273**, 33803-3381
- Rivas, G., Lopez, A., Mingorance, J., Ferrandiz, M.J., Zorrilla, S., Minton, A.P., Vicente, M. & Andreu, J.M. (2000). Magnesium-induced linear self-association of the FtsZ bacterial cell division protein monomer. The primary steps for assembly. **J. Biol. Chem.** **275**, 11740-11749
- Chacón, P., Díaz, J.F., Morán, F. & Andreu, J.M. (2000). Reconstruction of protein shape with x-ray solution scattering and a genetic algorithm. **J. Mol. Biol.**, **299**, 1289-130
- Díaz, J.F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A.A. & Andreu, J.M. (2000). Molecular recognition of taxol by microtubules: Kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site. **J. Biol. Chem.**, **275**, 26265-26276

- Díaz, J.F., Kralicek, A., Mingorance, J., Palacios, J.M., Vicente, M. & Andreu, J.M. (2001). Activation of cell division protein FtsZ: Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide gamma-phosphate **J. Biol. Chem.** **276**, 17307-17315
- Andreu, J.M. & Barasoain, I. (2001) The interaction of baccatin III with the Taxol binding site of microtubules determined by a homogeneous assay with fluorescent taxoid. **Biochemistry** **40**, 11975-11984
- Andreu, J.M., Oliva, M.A. and Monasterio, O. (2002). Reversible unfolding of FtsZ cell division proteins from archaea and bacteria. Comparison with eukaryotic tubulin folding and assembly.. **J. Biol. Chem.** **277**, 43262-43270.
- Díaz, J.F., Barasoain I. and Andreu J.M. (2003). Fast kinetics of taxol binding to microtubules. Effects of solution variables and microtubule-associated proteins. **J. Biol. Chem.** **278**, 8403-8419
- Oliva MA, Huecas S, Palacios JM, Martín-Benito J, Valpuesta JM, Andreu JM (2003) Assembly of archaeal cell division protein FtsZ and a GTPase inactive mutant into double-stranded filaments. **J. Biol. Chem.** **278**, 33562-33570
- Huecas S, Andreu JM (2003) Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch **J. Biol. Chem.** **278**, 37664-37671
- Martínez-Buey R, Díaz JF, Andreu JM, O'Brate A, Giannakakou P, Nicolaou KC, Sasmal PK, Ritzen A, Namoto K (2004) Interaction of epothilone analogs with the paclitaxel binding site. Relationship between binding affinity, microtubule stabilization and cytotoxicity **Chemistry & Biology** **11**, 225-236.
- Díaz JF, Barasoain I, Souto AA, Amat-Guerri F, Andreu JM (2005) Macromolecular accessibility of fluorescent taxoids bound at a paclitaxel binding site in the microtubule surface. **J. Biol. Chem.**, **280**, 3928-3937.
- Bertrand S, Barthelemy I, Oliva MA, Carrascosa JL, Andreu JM, Valpuesta JM (2005). Folding, stability and polymerization properties of FtsZ chimeras with inserted tubulin loops involved in the interaction with the cytosolic chaperonin CCT and in microtubule formation. **J. Mol. Biol.**, **346**, 319-330.
- Schlieper D, Oliva MA, Andreu JM, Löwe J (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: Evidence for horizontal gene transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **102**, 9170-9175.
- Buey RM, Barasoain I, Jackson E, Meyer A, Giannakakou P, Paterson I, Mooberry S, Andreu JM, Díaz JF (2005). Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: Thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity **Chemistry & Biology** **12**, 1269-1279.
- Buey R, Díaz JF, Andreu JM (2006) The nucleotide switch of tubulin and microtubule assembly: a polymerization-driven structural change **Biochemistry, New Concepts**, **45**, 5933-5938.
- Jimenez-Barbero J, Canales A, Northcote P, Buey RM, Andreu JM, Díaz JF (2006) NMR determination of the bioactive conformation of peloruside A bound to microtubules **J. Amer. Chem. Soc.** **128**, 8757-8765
- Buey RM, Calvo E, Barasoain I, Pineda O, Edler M.C., Matesanz R, Cerezo G, Vanderwal CD, Day BW, Sorensen EJ, Lopez JA, Andreu JM, Hamel E, Díaz JF (2007) Covalent binding of cyclostreptin at the microtubule pores and luminal taxol binding sites. **Nature Chem. Biol.**, **3**, 117-125 & cover.

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY
ORGANIZATION

世界知识产权组织

ORGANIZACIÓN MUNDIAL
DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL



ORGANISATION MONDIALE
DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

المنظمة العالمية للملكية الفكرية

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

PCT

11 September 2007

Re: *International Application No. PCT/ES2002/000262*
(filed on 31 May 2002)
published under No. WO 2003/008965
Your Ref: 1.2003.0394/MAD

Dear Mr. Ungria,

./.

Pursuant to your fax of 5 September 2007, please find enclosed, in accordance with PCT Rule 94.1(b), a copy of the record copy of the international application mentioned above certified as a true copy.

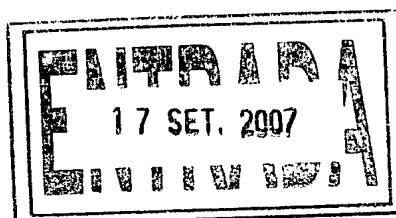
The amount of 50 Swiss Francs will be debited from your WIPO Account No. 11847.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fabienne Gateau', is written over a faint, larger signature.

Fabienne Gateau
Senior PCT Assistant
PCT Legal Affairs Section
PCT Legal Division

Mr. Javier Ungria
Ungria Patentes y Marcas, S.A.
Ramón y Cajal, 78
E-28043 Madrid



**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY
ORGANIZATION**

世界知识产权组织

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL
DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL**



**ORGANISATION MONDIALE
DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE**

المنظمة العالمية للملكية الفكرية

**ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

CERTIFICATION

It is hereby certified that the attached copy is a true copy of the record copy of International Application No. PCT/ES2002/000262, filed with the Spanish Patent Office as receiving Office on 31 May 2002 (31.05.2002) and received by the International Bureau on 19 June 2002 (19.06.2002), including any pages containing corrections and/or rectifications transmitted by the competent Authority to, and received by, the International Bureau before the completion of the technical preparations for international publication.

By: The International Bureau

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fabienne Gateau', is written over a circular stamp.



Fabienne Gateau
Senior PCT Assistant
PCT Legal Affairs Section
PCT Legal Division

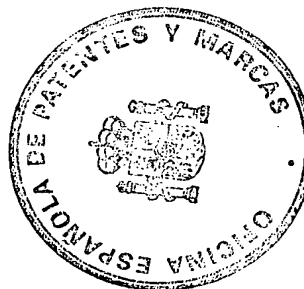
Date: 11 September 2007 (11.09.2007)

PETITORIO PCT

200101710

Original (para PRESENTACION) - impreso el 30.05.2002 12:21:50 PM

0	Para uso de la Oficina receptora únicamente	
0-1	Solicitud internacional No..	PCT E S O 2 / 00262
0-2	Fecha de presentación internacional	31 MAY 2002 (31.05.02)
0-3	Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud Internacional PCT"	DEMANDE INTERNATIONALE PCT SOLICITUD INTERNACIONAL PCT
0-4	Formulario - PCT/RO/101 Petitorio PCT	
0-4-1	Preparado usando	PCT-EASY Version 2.92 (actualizado el 01.01.2002)
0-5	Petición El abajo firmante solicita que la presente solicitud internacional sea procesada de acuerdo con el Tratado de Cooperación en materia de Patentes	
0-6	Oficina receptora (indicada por el solicitante)	Oficina Española de Patentes y Marcas (RO/ES)
0-7	Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	200101710
I	Título de la invención	METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS MIMETICOS DE PACLITAXEL.
II	Solicitante	
II-1	Esta persona es:	solicitante únicamente
II-2	Solicitante para	todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América
II-4	Nombre	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
II-5	Dirección:	C/Serrano, 117 28006 MADRID España
II-6	Estado de nacionalidad	ES
II-7	Estado de domicilio	ES
II-8	No. de teléfono	91 585.50.00
II-9	No. de telefacsimile	91 585.52.87



PETITORIO PCT

200101710

Original (para PRESENTACION) - impreso el 30.05.2002 12:21:50 PM

III-1	Solicitante e/o inventor	
III-1-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-1-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-1-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	ANDREU MORALES, José, Manuel
III-1-5	Dirección:	Ctro. Inv. Biológicas Consejo Superior de Investigaciones Científicas C/Velázquez, 144 28006 MADRID España
III-1-6	Estado de nacionalidad	ES
III-1-7	Estado de domicilio	ES
III-2	Solicitante e/o inventor	
III-2-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-2-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-2-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	DÍAZ PEREIRA, José, Fernando
III-2-5	Dirección:	Ctro. Inv. Biológicas Consejo Superior de Investigaciones Científicas C/Velázquez, 144 28006 MADRID España
III-2-6	Estado de nacionalidad	ES
III-2-7	Estado de domicilio	ES
III-3	Solicitante e/o inventor	
III-3-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-3-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-3-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	BARASOAIN BLASCO, María, Isabel
III-3-5	Dirección:	Ctro. Inv. Biológicas Consejo Superior de Investigaciones Científicas C/Velázquez, 144 28006 MADRID España
III-3-6	Estado de nacionalidad	ES
III-3-7	Estado de domicilio	ES

PETITORIO PCT

200101710

Original (para PRESENTACION) - impreso el 30.05.2002 12:21:50 PM

IV-1	Mandatario o representante común; o dirección para la correspondencia La persona identificada a continuación se designa/ha sido designada para actuar en nombre del/de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como:	mandatario
IV-1-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	REPRESA SÁNCHEZ, Domingo
IV-1-2	Dirección:	Consejo Superior de Investigaciones Científicas Oficina de Transferencia de Tecnología C/Serrano, 113 - 2ª planta 28006 MADRID España
IV-1-3	No. de teléfono	91 585.52.77
IV-1-4	No. de telefaxímile	91 585.52.87
IV-1-5	Correo electrónico	drepresa@orgc.csic.es
V	Designación de Estados	
V-1	Patente regional (otros tipos de protección o de tramitación, si es posible hacerlo, están indicados entre paréntesis a continuación de la(s) designación(es) correspondiente(s))	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW y cualquier otro Estado contratante del Protocolo de Harare y del PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM y cualquier otro Estado contratante del Convenio sobre la Patente Euroasiática y del PCT EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR y cualquier otro Estado contratante del Convenio sobre la Patente Europea y del PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG y cualquier otro Estado que sea Estado miembro de la OAPI y que sea un Estado contratante del PCT
V-2	Patente nacional (otros tipos de protección o de tramitación, si es posible hacerlo, están indicados entre paréntesis a continuación de la(s) designación(es) correspondiente(s))	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM ZW

PETITORIO PCT

200101710

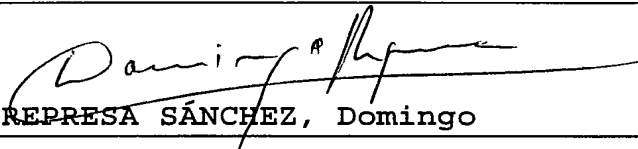
Original (para PRESENTACION) - impreso el 30.05.2002 12:21:50 PM

V-5	Declaración de designación precautoria Además de las designaciones efectuadas en los puntos V-1, V-2 y V-3, el solicitante efectuará también, en virtud de la Regla 4.9.b), todas las designaciones que estén permitidas con arreglo al PCT, salvo la(s) designación(es) del(de los) Estado(s) indicado(s) en el punto V-6 a continuación. El solicitante declara que esas designaciones adicionales están sujetas a confirmación y que cualquier designación que no se confirme antes de que expiren los 15 meses a partir de la fecha prioritaria se considerará retirada por el solicitante al expirar dicho plazo.		
V-6	Exclusión de las designaciones precautorias	NINGUNA	
VI-1	Reivindicación de prioridad de una solicitud nacional anterior		
VI-1-1	Fecha de depósito	20 Julio 2001 (20.07.2001)	
VI-1-2	Número	P200101710	
VI-1-3	País	ES	
VI-2	Petición de documento de prioridad Se ruega a la Oficina receptora que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) anterior(es) identificada(s) supra como punto(s):	VI-1	
VII-1	Administración encargada de la búsqueda internacional elegida	Oficina Española de Patentes y Marcas (ISA/ES)	
VIII	Declaraciones	Número de declaraciones	
VIII-1	Declaración sobre la identidad del inventor	-	
VIII-2	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, para solicitar y que le sea concedida una patente	-	
VIII-3	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior	-	
VIII-4	Declaración sobre la calidad de inventor (sólo para la designación de los Estados Unidos de América)	-	
VIII-5	Declaración sobre las divulgaciones no perjudiciales o las excepciones a la falta de novedad	-	
IX	Lista de verificación	número de hojas	fichero(s) electrónico(s) adjunto(s)
IX-1	Petitorio (incluidas las hojas de declaración)	6	-
IX-2	Descripción	17	-
IX-3	Reivindicaciones	2	-
IX-4	Resumen	1	EZABST00.TXT
IX-5	Dibujos	2	-
IX-7	TOTAL	28	

PETITORIO PCT

200101710

Original (para PRESENTACION) - impreso el 30.05.2002 12:21:50 PM

	Elementos de acompañamiento	documento(s) en papel adjunto(s)	fichero(s) electrónico(s) adjunto(s)
IX-8	Hoja de cálculo de tasas	✓	-
IX-17	Disquete PCT-EASY	-	Disquete
IX-19	Figura de los dibujos que debe acompañar el resumen		
IX-20	Idioma de presentación de la solicitud internacional	español	
X-1	Firma del solicitante, del mandatario o del representante común		
X-1-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	REPRESA SÁNCHEZ, Domingo	
X-2	Firma del solicitante, del mandatario o del representante común		
X-2-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	ANDREU MORALES, José, Manuel	
X-3	Firma del solicitante, del mandatario o del representante común		
X-3-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	DÍAZ PEREIRA, José, Fernando	
X-4	Firma del solicitante, del mandatario o del representante común		
X-4-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	BARASOAIN BLASCO, María, Isabel	

PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA UNICAMENTE

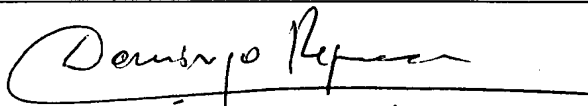

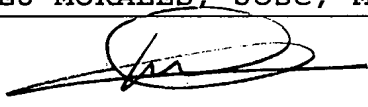
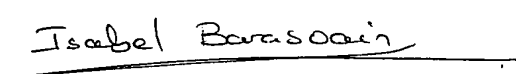
10-1	Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional	(31.05.02) 31 MAY 2002
10-2	Dibujos:	RECIBIDO
10-2-1	Recibido	
10-2-2	No recibido	
10-3	Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior pero dentro del plazo, de documentos o de dibujos que completan la pretendida solicitud internacional	
10-4	Fecha de recepción, dentro del plazo, de las correcciones solicitadas según el Artículo 11(2) del PCT	
10-5	Administración encargada de la búsqueda internacional	ISA/ES
10-6	Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda	X

REPLACED

PETITORIO PCT

200101710

Original (para PRESENTACION) - impreso el 30.05.2002 12:21:50 PM

	Elementos de acompañamiento	documento(s) en papel adjunto(s)	fichero(s) electrónico(s) adjunto(s)
IX-8	Hoja de cálculo de tasas	✓	-
IX-17	Disquete PCT-EASY	-	Disquete
IX-19	Figura de los dibujos que debe acompañar el resumen		
IX-20	Idioma de presentación de la solicitud internacional	español	
X-1	Firma del solicitante, del mandatario o del representante común		
X-1-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	REPRESA SÁNCHEZ, Domingo	
X-2	Firma del solicitante, del mandatario o del representante común		
X-2-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	ANDREU-MORALES, José, Manuel	
X-3	Firma del solicitante, del mandatario o del representante común		
X-3-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	DÍAZ PEREIRA, José, Fernando	
X-4	Firma del solicitante, del mandatario o del representante común		
X-4-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	BARASOAIN BLASCO, María, Isabel	

PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA UNICAMENTE

10-1	Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional	(31.05.02)	31 MAY 2002
10-2	Dibujos:	RECIBIDO	
10-2-1	Recibido		
10-2-2	No recibido		
10-3	Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior pero dentro del plazo, de documentos o de dibujos que completan la pretendida solicitud internacional		
10-4	Fecha de recepción, dentro del plazo, de las correcciones solicitadas según el Artículo 11(2) del PCT		
10-5	Administración encargada de la búsqueda internacional	ISA/ES	
10-6	Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda		

PETITORIO PCT

200101710

Original (para PRESENTACION) - impreso el 30.05.2002 12:21:50 PM

PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL UNICAMENTE

11-1	Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional	19 JUN 2002	(19.06.02)
------	---	-------------	--------------

TITULO:

METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS MIMETICOS DE PACLITAXEL.

SECTOR DE LA TECNICA:

- 5 Sector farmacéutico. Agentes antitumorales. Ensayo homogéneo de alto rendimiento para la detección de sustancias que puedan sustituir a paclitaxel en su sitio de unión en los microtúbulos y por tanto con actividad potencial como agentes antitumorales.

ESTADO DE LA TECNICA:

- 10 El paclitaxel (Taxol ®), un compuesto muy empleado en la quimioterapia del cáncer, presenta como otros agentes anticancerosos, efectos secundarios. Este compuesto diterpenoide se extrajo originalmente de la corteza de una planta, *Taxus brevifolia*, de crecimiento lento, lo que conllevaba un problema de falta de una fuente barata y disponible de paclitaxel. El paclitaxel utilizado
- 15 actualmente es un producto de semisíntesis a partir de un precursor extraído de la hoja del tejo. Además, el paclitaxel presenta problemas de extrema insolubilidad. Por lo tanto, aunque el paclitaxel es un agente quimioterapéutico con una muy importante actividad biológica, el descubrimiento de nuevas fuentes de paclitaxel o bien de compuestos miméticos de paclitaxel tiene una
- 20 decisiva utilidad.
- El paclitaxel promueve el ensamblaje de $\alpha\beta$ -tubulina en microtubulos por unión preferencial a tubulina ensamblada más que a la tubulina no ensamblada. Su efecto está relacionado con el del nucleótido GTP, con importantes diferencias. El GTP se une a un extremo del dímero de tubulina haciendo contacto con el
- 25 siguiente dímero a lo largo de cada protofilamento que forma el microtúbulo, mientras el paclitaxel se une a un lado de β -tubulina cerca del contacto con el siguiente protofilamento; en la α -tubulina, la zona correspondiente a la cavidad de unión a paclitaxel está ocupada por un bucle de la cadena peptídica (Nogales, E.). Los dímeros de tubulina sin ensamblar unen GTP y el sitio de
- 30 unión queda ocluido por el ensamblaje, mientras el sitio de unión a paclitaxel existe sólo en tubulina ensamblada. La hidrólisis de GTP permite el

desensamblaje y la regulación del sistema de microtúbulos, sin embargo, la activación de la tubulina por paclitaxel es permanente, estabilizando los microtúbulos.

La supresión de la dinámica de microtúbulos celular por paclitaxel es una causa principal de la inhibición de la división celular y de la muerte de las células tumorales (Jordan, M.A. y Wilson, L.). Un número de sustancias naturales diversas, incluyendo epotilonas (Bollag, D.M. et al), discodermolida (Ter Haar, E. et al), eleuterobina (Long, B.H. et al), y laulimalida (Mooberry, S.I. et al) imitan los efectos citotóxicos de paclitaxel, aparentemente uniéndose a su sitio en los microtúbulos. Cada una de estas sustancias fue descubierta con diferentes ensayos para actividades similares a la de paclitaxel.

Algunas patentes describen métodos para identificar compuestos con actividades semejantes a paclitaxel. En la patente americana US 5340724 (Upjohn Co.) se describe un método empleando células (Tax 2-4 CHO) dependientes de paclitaxel y detectando su crecimiento. La solicitud PCT WO9420134 (Universidad de Columbia) proporciona dos anticuerpos monoclonales producidos por dos hibridomas que son capaces de unirse a paclitaxel y a sus análogos, así como su utilización para determinar la presencia y cantidad de paclitaxel o sus derivados biológicamente activos. Otra solicitud PCT WO0056894 (Cytoclonal pharmaceuticals, Inc.), describe las secuencias de ADN que codifican la beta tubulina de distintas especies de hongos del género Pestalotiopsis, estos segmentos de ADN purificados se emplean para detectar compuestos con actividad antitumoral. Otra solicitud PCT WO 9953295 (Universidad de California), consiste en un método para la detección de agentes que modulan la despolimerización de los microtúbulos, poniendo en contacto microtúbulos polimerizados, una proteína que los despolimeriza y las sustancias a ensayar en presencia de ATP o GTP y detectando la formación de monómeros, dímeros u oligómeros de tubulina mediante diferentes métodos como cambio de fluorescencia (DAPI), centrifugación, etc.

Sin embargo, en contraste con otras dianas biológicas importantes, hasta ahora se carecía de un ensayo estándar para detectar y medir directamente otros

ligandos cualesquiera capaces de reemplazar a paclitaxel en su sitio de unión en los microtúbulos.

Los métodos basados en la luminiscencia son muy útiles para estos propósitos.

Los derivados fluorescentes, hidrosolubles y activos, de paclitaxel unidos con

5 un intermediario de alanina en la posición no esencial 7 (Souto, A.A. et al) son sondas específicas del sitio de unión de paclitaxel a los microtúbulos (Evangelio, J.A., et al). Estos taxoides fluorescentes se han usado principalmente para localizar sitios subcelulares de unión de taxoide citotóxico a microtúbulos del polo del huso y a centrosomas (Abal, M.A., et al), así como
10 para medir la cinética rápida de unión y de disociación del sitio de paclitaxel, que está expuesto en microtúbulos (Díaz, J.F., et al).

El objeto primordial de esta invención es el desarrollo un ensayo fluorescente homogéneo de unión de ligando al sitio de paclitaxel en los microtúbulos, que permite la detección de alto rendimiento de nuevos miméticos de paclitaxel. El

15 método se basa en la combinación de dos componentes, una diana y una sonda. La diana está constituida por microtúbulos ensamblados in vitro los cuales se estabilizan mediante entrecruzamiento químico y se conservan en nitrógeno líquido. Este método de conservación es novedoso. Como sonda se emplean derivados fluorescentes de paclitaxel, que se unen específicamente a
20 los microtúbulos (patentes ES 2121549, ES 2105983, WO9719938, Consejo Superior de Investigaciones Científicas) (Díaz, J.F., et al).

Las aplicaciones de este método son: búsqueda de nuevos agentes antitumorales a partir de bibliotecas de extractos y compuestos naturales y sintéticos; evaluación de modificaciones químicas de series de compuestos
25 existentes (incluyendo paclitaxel, epotilona, discodermolida, euterobina, laulimalida); valoración de contenido en taxanos activos en fuentes naturales; investigación biológica y oncológica.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Descripción breve de la invención

El sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos también une otros ligandos recientemente descubiertos con actividad antitumoral. En la presente invención se ha diseñado un ensayo homogéneo de alto rendimiento para la detección de biomiméticos de paclitaxel, basado en el desplazamiento del taxoide fluorescente 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel de su sitio de unión en soluciones diluidas de microtúbulos conservados.

El método de detección, objeto de la presente invención y que se reivindica, se basa en la combinación de los dos componentes, la diana, que consiste en los microtúbulos ensamblados in vitro que se estabilizan mediante entrecruzamiento químico y se conservan indefinidamente congelados en nitrógeno líquido hasta su utilización, este método de conservar los microtúbulos también se reivindica en la presente invención, y la sonda, que consiste en dicho derivado fluoresceinado de paclitaxel que se une específicamente a los microtúbulos.

El método consiste en la adición de las sustancias a ensayar (no fluorescentes) a múltiples alícuotas de una solución diluida de la diana y la sonda en microplacas multipocillo. Las sustancias a ensayar pueden ser los compuestos de las familias de discodermolida, eleuterobina, sarcodicitina, epotilonas y paclitaxel. Este método también tiene aplicación para medir contenidos activos de tipo paclitaxel de fuentes naturales y para la detección de alto rendimiento de nuevos biomiméticos de paclitaxel.

La sonda unida a la diana posee un valor de anisotropía de fluorescencia mucho mayor que el de la sonda libre; el desplazamiento por cualesquiera sustancias competidoras de la interacción de la sonda (ligando de referencia) con la diana se detecta midiendo el descenso de anisotropía de la fluorescencia de la sonda con un lector de polarización de fluorescencia en microplacas. Alternativamente se utiliza el descenso de transferencia resonante de energía (RET) de la sonda unida a un ligando aceptor rodaminado, 7-O-[N-(4'-tetrametilrodamina-carbonil)-L-alanil-] Paclitaxel o el cambio de intensidad de fluorescencia de la sonda 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil-]

Paclitaxel. Este método tiene aplicación en el desarrollo de herramientas para la realización de ensayos en investigación oncológica y/o biológica.

También es objeto de la presente invención el método para conservar los microtúbulos indefinidamente. Este método consiste en dializar los
5 microtúbulos entrecruzados contra un tampón de conservación y criopreservarlos.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de establecer un ensayo eficaz de competición basado en
10 fluorescencia para la unión de ligando al sitio de paclitaxel en los microtúbulos, se investigaron los cambios de las propiedades fluorescentes de la sonda 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel (Flutax-2;10) sobre la unión específica a microtúbulos. El Flutax-2 se prefirió al análogo Flutax-1 con fluoresceína no fluorada por su superior fotoestabilidad y pK ácido (dando el di-
15 anión fuertemente fluorescente a valores de pH neutros). Se investigaron métodos de anisotropía de fluorescencia y de transferencia de energía de resonancia (RET), y medidas de intensidad de la emisión (con Flutax-1). Puesto que los microtúbulos se unen a Paclitaxel y a Flutax con gran afinidad, se necesitan bajas concentraciones de sitios de unión con el fin de detectar los
20 competidores de afinidad inferior. Estos sitios de unión estabilizados por dilución fueron proporcionados por microtúbulos entrecruzados suavemente (ver Ejemplo; Evangelio, J.A. et al.; Diaz, J.F. et al.).

Validación de la sonda y diana. A) Medida de la unión específica de Flutax-2 a microtúbulos mediante anisotropía de fluorescencia y su cancelación por
25 paclitaxel

La intensidad de fluorescencia de Flutax-2 cambia muy poco con la unión a microtúbulos. Hay un pequeño cambio en el máximo de excitación de 494nm a 495nm (punto isobéstico a 500nm) y un desplazamiento azul de emisión de 523nm a 520nm (no mostrado aquí, punto isobéstico a 525nm; Diaz, J.F. et al.). Sin embargo, la polarización de fluorescencia de Flutax-2 aumenta
30 significativamente por la unión. Se compararon el espectro de anisotropía de excitación de una solución de sitios de microtúbulo-Flutax-2 50nM con el

espectro de una solución similar en la que los sitios de unión fueron bloqueados con un exceso de paclitaxel y con el del Flutax-2 libre. Tanto la anisotropía negativa de la banda 329nm como la anisotropía positiva de la transición de excitación de energía inferior (495nm) de la difluoro-fluoresceína son específicamente aumentados por unión de Flutax-2 a microtúbulos. Los valores de anisotropía determinados para la banda 495nm (emisión 520nm; tampón GAB que contiene glicerol, 25°C) fueron: Flutax-2 libre (50nm), $r_{\min} = 0,055$; en presencia de microtúbulos bloqueados con paclitaxel, $r = 0,060$; Flutax-2 específicamente unido a los microtúbulos, $r_{\max} = 0,29$ (el último se determinó por valoración de Flutax-2 50nm con concentraciones crecientes de microtúbulos). Estos cambios son consistentes con una fuerte inmovilización del fluoróforo por la unión. Además del anclaje de Flutax-2 a través de su resto paclitaxel, se ha propuesto una interacción del di-anion fluoresceína con un residuo catiónico de microtúbulos, posiblemente Arg 282 de β -tubulina (Evangelio, J.A. et al.; ver Fig. 10 en Díaz, J.F. et al.).

Una isoterma de unión de Flutax-2 a microtúbulos, determinada a partir del cambio de anisotropía del ligando, indica una constante de equilibrio de la unión con valor $K_b = 11,5 \pm 0,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ en tampón GAB-GDP a 25°C (no es significativamente diferente de los valores previamente determinados por centrifugación (Díaz, J.F. et al.). La unión de Flutax-2 a estas concentraciones es completamente anulada por paclitaxel $10\mu\text{M}$.

Basándose en estos resultados, en la observación de la capacidad de Flutax-2 de sustituir a ^3H -Paclitaxel de su sitio de unión, y en los resultados previos discutidos en un estudio cinético detallado (Díaz, J.F. et al.), Flutax-2 puede considerarse una sonda genuina del sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos.

Validación de la sonda y diana. B) Detección de la unión de Flutax-2 a microtúbulos mediante transferencia de energía (RET) a otro taxoide fluorescente y su cancelación por paclitaxel.

Las distancias de mayor proximidad entre sitios de unión a paclitaxel en subunidades de β -tubulina de microtúbulos son ca. 5,5, 8 y 9,5nm (Nogales, E., et al.), un intervalo de distancia apropiado para RET desde fluoresceína a fluoróforos de rodamina. El desplazamiento del donador o aceptor de sus sitios

de unión por otro ligando no fluorescente suprimiría la emisión del aceptor por excitación del donador. El espectro de emisión (excitación a 460nm) de sitios de unión de microtúbulos 50nM con Flutax-2 10nM y Rotax 40nM (7-O-[N-(4'-tetrametilrodamina-carbonil)-L-alanil-] Paclitaxel (Evangelio, J.A. et al) mostró un pico de emisión sensibilizada de Rotax, además de la emisión de Flutax-2 . Cuando los sitios de unión se bloquearon con paclitaxel la emisión de fluoresceína aumentó (no se apagó) y cambió de 521 a 524 nm, mientras la contribución de rodamina decreció a un nivel (un hombro) que era similar al de la emisión no sensibilizada de Rotax a 582nm. Este experimento indicó la posibilidad de detectar una unión de ligando al sitio de paclitaxel por el decrecimiento de RET.

Validación de la sonda y diana. C) Detección de la unión de Flutax-1 a microtúbulos mediante transferencia de energía (RET) a otro taxoide fluorescente y su cancelación por paclitaxel.

Utilizando Flutax-1 es posible caracterizar el desplazamiento por variación de la intensidad de fluorescencia.

Ensayo fluorescente de detección y evaluación de ligandos que interaccionan con el sitio de unión de paclitaxel en los microtúbulos.

Usando Flutax-2 como una sonda de referencia del sitio de unión a paclitaxel, la unión de otros ligandos no fluorescentes que desplazan Flutax-2 de los microtúbulos (ver Figura 1) puede medirse fácilmente por los cambios en sus propias propiedades de fluorescencia en un ensayo de competición. Se ha empleado el cambio en la anisotropía de fluorescencia, que fue analizado en placas de 96 pocillos con un lector de microplaca. La Figura 2 muestra cómo el paclitaxel y el docetaxel disminuyen eficazmente la anisotropía de fluorescencia de soluciones de Flutax-2 50nM- sitios de microtúbulos 50nM. El análisis numérico de las isothermas de desplazamiento (ver Ejemplo) indicó que paclitaxel y docetaxel se unen a microtúbulos con constantes de unión de equilibrio de $(3,7 \pm 1,5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (4 determinaciones) y $(6,0 \pm 2,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (2 determinaciones) respectivamente a 25°C. La relación de afinidades de docetaxel a paclitaxel fue $2,7 \pm 0,2$ a partir de los experimentos individuales. Una afinidad 2 veces mayor de docetaxel comparado con paclitaxel está de

acuerdo con una determinación directa previa (Díaz, J.F. y Andreu, J.M.). La afinidad de paclitaxel es del mismo orden de magnitud que los valores previamente determinados para paclitaxel (Parness, J. y Horwitz, S.B.), 2-debenzoil-2-(m-aminobenzoil) paclitaxel (Han. Y., et al.) y 3'-N-m-aminobenzamido-3'-N-debenzamido-Paclitaxel (Li, Y. et al.). La baccatina III, generalmente considerada hasta ahora como un compuesto inactivo, inhibió completamente la anisotropía de microtúbulo Flutax-2, aunque a concentraciones totales aproximadamente 200 veces más grandes que paclitaxel (ver Fig. 1). El análisis de los datos de desplazamiento indicó que baccatina III es reconocida por el sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos con una constante de equilibrio de $(1,5 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (7 determinaciones). Baccatina III es equivalente al sistema de anillo taxano, en el que el grupo C-13 OH sustituye a la cadena lateral de paclitaxel (ver estructuras químicas en la Fig. 2). La cadena lateral C-13 ha sido considerada previamente como un determinante esencial para el reconocimiento de paclitaxel. Sin embargo, el éster metílico de la cadena lateral C-13 fue, dentro de su límite de solubilidad, inactivo para desplazar a Flutax-2. Los resultados indicaron una constante de equilibrio de unión inferior a 10^3 M^{-1} para este análogo de la cadena lateral C-13 separado del resto de la molécula (ver Fig. 2; 2 determinaciones).

En una serie de medidas de control, el desplazamiento de la interacción de ^3H -paclitaxel con microtúbulos por baccatina III y Flutax-2 se evidenció por sedimentación y conteo de centelleo. Los resultados de estas mediciones (ver Ejemplo) fueron compatibles con los de los ensayos de anisotropía de fluorescencia, excepto para una afinidad aparente 7-veces inferior de Flutax-2. Esto confirmó que baccatina III se reconoce por el sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos. Sin embargo, con el fin de tener la mayoría del trazador radiactivo ^3H -paclitaxel en solución, en vez de adsorberse al tubo de policarbonato de la ultracentrífuga de mesa, fue necesario incluir 1 mg mL^{-1} de seroalbúmina bovina, que une paclitaxel (manteniéndolo disponible para la interacción con microtúbulos) así como Flutax-2 (disminuyendo su afinidad aparente). Estos procesos de adsorción imposibilitan una medida rigurosa directa de la afinidad de la unión a paclitaxel a microtúbulos en nuestras

manos, y por tanto de la afinidad de sus competidores usando paclitaxel como un ligando de referencia en estos ensayos diluidos. Las desventajas adicionales de los ensayos de unión de ^3H -paclitaxel en comparación con el ensayo homogéneo de anisotropía de taxoide fluorescente, son las operaciones de centrifugación, separación y medición radioactiva, requeridas.

Utilización del ensayo de anisotropía de fluorescencia en microplaca en comparación con otros métodos para detectar miméticos de paclitaxel.

El método fluorescente de detección de unión de ligandos al sitio paclitaxel de microtúbulos desarrollado en este trabajo constituye un primer ensayo homogéneo para cualquier otra sustancia que actúe sobre este importante blanco antitumoral. Su simplicidad se compara favorablemente con métodos de cribaje (screening) basados en la estabilización de microtúbulos (Bollag, D.M., et al.; www.cytoskeleton.com) y con los ensayos competitivos que utilizan Paclitaxel marcado radiactivamente (más arriba, Bollag, D.M. et al.; Diaz, J.F. y Andreu, J.M.). Los anticuerpos monoclonales específicos de taxano ofrecen sensibilidad posiblemente insuperable para la determinación de contenidos de fármacos y compuestos estrechamente relacionados (Grothaus, P.G., et al.; O'Boyle, K.P.; Bicomumpaka, C. y Page, M.), sin embargo, pueden fallar en reconocer ligandos no relacionados químicamente del sitio de unión a paclitaxel del microtúbulo. Puesto que se pueden analizar fácilmente múltiples muestras con el método de polarización por fluorescencia, este ensayo constituye una herramienta útil para la evaluación de la afinidad de unión de compuestos recientemente diseñados de las familias de discodermolida, eleuterobina, epotilonas y paclitaxel. También es aplicable a la medición de contenidos activos tipo paclitaxel de fuentes naturales, y para la investigación de alto rendimiento de nuevos biomiméticos de paclitaxel, en un modo complementario de las exploraciones celulares para inhibidores mitóticos, como los utilizados en el descubrimiento de monastrol (Mayer, T.U., et al.). Una propiedad interesante del ensayo de anisotropía de fluorescencia es su sensibilidad para la detección de ligandos de afinidad media. Ello es posible por la combinación de un taxoide altamente fluorescente (Flutax-2) con microtúbulos estabilizados, permitiendo la gran dilución necesaria para el desplazamiento efectivo de la sonda por

ligantes más débiles, que de otra forma no se detectarían. Un ejemplo es la detección de la unión de baccatina III, que proporciona una nueva visión del reconocimiento molecular de paclitaxel por microtúbulos.

5 BIBLIOGRAFIA

- Abal, M.A., Souto, A.A., Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., Andreu, J.M. y Barasoain, (2001) *Cell Motil. Cytosk.* 49, 1-15
- Andreu, J.M., Perez-Ramirez, B., Gorbunoff, M.J., Ayala, D. y Timasheff, S.N. (1998) *Biochemistry* 37, 8356-8368.
- 10 Bcamumpaka, C. y Page, M. (1998) *J. Immunol. Meth.* 212, 1-7.
- Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Henses, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Diaz, J.F. y Andreu, J.M. (1993) *Biochemistry* 32, 2747-2755.
- Díaz, J.F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A.A. y Andreu, J.M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 26265-26276
- 15 Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuña, A.U., Amat- Guerri, F., y Andreu, J.M. (1998) *Cell Motil. Cytoskel.* 39, 73-90.
- Grothaus, P.G., Bignami, G.S., O'Malley, S., Harada, K.E., Byrnes, J.B., Waller, D.F., Raybould, T.J., McGuire, M.T. y Alvarado, B. (1995) *J. Nat. Prod.* 58, 1003-1014.
- 20 Han, Y., Chaudhary, A.G., Chordia, M.D., Sackett, D.L., Perez-Ramirez, B., Kingston, D.G. y Bane S. (1996) *Biochemistry* 35, 14173-14183
- Jimenez-Barbero, J., Souto, A.A., Abal, M., Barasoain, I., Evangelio, J.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., y Amat-Guerri, F. (1998) *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1857-1863.
- 25 Jordan, M.A. y Wilson, L. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 123-130
- Lackowicz J.R. (1999) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer/ Plenum, New York, N.Y.
- Li, Y., Edsall, R. Jr., Jagtap, P.G., Kingston, D.G.I., y Bane, S. (2000) *Biochemistry* 39, 616-623
- 30 Long, B.H., Carboni, J.M., Wasserman, A.J., Cornell, L.A., Casazza, A.M., Jensen, P.R., Lindel, T., Fenical, W. y Fairchild, CR. (1998) *Cancer Res.* 58, 1111-1115.

- Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L. y Mitchison, T.J. (1999) *Science* 286, 971-974
- Medrano, F.J., Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J. y Timasheff, S.N. (1991) *Biochemistry* 30, 3770-3777.
- 5 Mooberry, S.I., Tien, G., Hernandez, A.H., Plubrukarn, A. y Davidson, B.S. (1999) *Cancer Res.* 59, 653-660
- Nogales, E. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277-302.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. y Downing, K.H. (1999) *Cell* 96, 79-88.
- 10 Nogales, E., Wolf, S.G. y Downing, K. (1998) *Nature* 391, 199-203.
- O'Boyle, K.P., Wang, Y., Schwarz, E.L., Regl, D.L., Einzig, A., Dutcher, J.P., Wiernik, P.H. y Horwitz, S.B. (1997) *Cancer* 79, 1022-1030
- Parness, J. and Horwitz, S.B. (1981) *J. Cell. Biol.* 91, 479-487.
- Souto, A.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., Barasoain, I., Abal, M., y Amat-Guerri, F. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 2710-2712.
- 15 Ter Haar, E., Kowalsky, R.J., Lin, C.M., Longley, R.E., Gunasekera, S.P., Rosenkranz, H.S., y Day, B.W. (1996) *Biochemistry* 35, 243-250.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS FIGURAS

- 20 **FIGURA 1.** Una micrografía de fluorescencia de una mezcla de reacción típica utilizada en esta invención, que consiste en microtúbulos estabilizados (sitios de taxoide 100nM) y Flutax-2 taxoide fluorescente (100nM). La barra indica 10µm.
- 25 **FIGURA 2.** Isotermas de competición de ligandos que se unen al sitio de paclitaxel de microtúbulos en tampón GAB-GDP a 25°C. La anisotropía de fluorescencia de soluciones múltiples de Flutax-2 50nM y sitios de unión de microtúbulos 50nM con diversas concentraciones de competidores se midió por duplicado, utilizando un lector de microplaca. Los círculos sólidos, paclitaxel
- 30 (1); los círculos vacíos, docetaxel; los cuadrados, baccatina III (2), los triángulos, éster metílico de la cadena lateral C-13 de paclitaxel (3); las cruces, controles correspondientes con DMSO 1% (v/v) sin ligando. En este ensayo,

cada curva de competición comienza con un valor de anisotropía correspondiente a dos tercios de moléculas de Flutax-2 unidas, que se reducen progresivamente por el competidor que sustituye a Flutax-2 en los sitios de unión. La constante de equilibrio de unión de Flutax-2 es $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Las

5 líneas 1 (discontinua corta) y 2 (continua) corresponden a los mejores ajustes para la unión de paclitaxel y baccatina al mismo sitio con valores de constante de equilibrio de $K = 3,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $K = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ respectivamente; la línea larga discontinua es el ajuste a los datos de docetaxel, $K = 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$; la línea de puntos que pasa a través de los datos del éster metílico de cadena lateral es

10 una simulación de una unión de afinidad baja con $K = 7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (obsérvese que estos últimos datos son similares a los de los controles).

EJEMPLO DE REALIZACION DE LA INVENCION

1. Taxoides. Sonda fluorescente.

15 Se prepararon soluciones de serie concentradas y se mantuvieron a -20°C en ambiente seco. El paclitaxel (del National Cancer Institute ,Bethesda, MD) se midió espectrofotométricamente a 273nm después de dilución en metanol, usando un coeficiente de extinción de $1.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Diaz, J.F. y Andreu, J.M.). ^3H -Paclitaxel (4 Ci mmol^{-1}) se obtuvo de Moravek Biochemicals (Brea,

20 CA). Docetaxel (Taxotere) fue proporcionado por Rhône-Poulenc Rorer (Antony, France). Baccatina III se obtuvo de Sigma; se encontró desprovisto de impurezas por HPLC (un gradiente 20-80% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético acuoso al 0,05%, en una columna C-18, monitorizado a 228nm). Un coeficiente de extinción de baccatina III determinado aproximadamente fue

25 $900 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (273nm, metanol). Baccatina III era soluble a las concentraciones utilizadas en fosfato sódico 10mM, etilenglicol bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetracético (EGTA) 1mM, GTP 0,1mM, MgCl_2 6mM, glicerol 3,4 M, (tampón GAB) pH 6,5 con DMSO al 1%. El éster metílico de la cadena lateral C-13 de paclitaxel fue proporcionado por E. Baloglu y D.G.I.

30 Kingston del Virginia Polytechnic Institute (Blacksburg, VA). La absorptividad molar de este compuesto es de alrededor de $750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 273nm (cola de absorción, metanol) y era soluble a 0,75mM en tampón GAB-DMSO 1%.

Obsérvese que las absorptividades 273nm añadidas de baccatina III y el éster metílico de la cadena lateral eran aproximadamente las de paclitaxel. F. Amat-Guerri, del Instituto de Química Orgánica, CSIC (Madrid, España) proporcionó la sonda fluorescente Flutax-2; se comprobó su pureza con HPLC y se determinó su concentración espectrofotométricamente con dodecil sulfato de sodio al 0,5% (SDS), a pH neutro, usando un coeficiente de extinción de 49,100 $M^{-1} cm^{-1}$ a 496nm (Díaz, J.F., et al.).

2. Diana: microtúbulos entrecruzados.

Se purificó y almacenó tubulina de cerebro bovino, y se midió su concentración como se ha descrito (Andreu, J.M., et al.). Antes de su utilización se equilibró en fosfato sódico 10mM, EGTA 1mM, GTP 0,1mM, glicerol 3,5M pH 6,8, con una columna de gravedad de Sephadex G-25 en frío, y se centrifugó 10 min. a 50.000 en un rotor TLA 100,4 en frío (Beckman). La tubulina 50 μ M se hizo 6mM en $MgCl_2$ (es decir tampón de ensamblaje de glicerol GAB, pH final 6,5) y GTP 1mM, se ensambló en microtúbulos a 37°C y estos se entrecruzaron suavemente con glutaraldehído 20mM, deteniendo la reacción con $NaBH_4$ como se ha descrito (Díaz, J.F., et al.). Estos microtúbulos entrecruzados tienen la misma especificidad, cinética, y estequiometría de unión de Flutax-2, que los controles no entrecruzados; tienen una morfología normal bajo el microscopio electrónico (Díaz, J.F., et al.). Los microtúbulos entrecruzados se dializaron contra GAB-0,1 mM nucleótido (GTP o GDP) durante más de 16h en frío en cassetes de diálisis (Pierce) y se conservaron congelados gota a gota bajo nitrógeno líquido, o bien a 4°C con 0,05% de azida sódica. Este método de conservación de los microtúbulos entrecruzados, mediante diálisis contra un tampón de conservación y criopreservación se reivindica en la presente invención.

Su concentración de tubulina total se midió después de diluirlos en SDS al 1% utilizando un coeficiente de extinción de 107,000 $M^{-1} cm^{-1}$ a 275nm (Díaz, J.F. y Andreu, J.M.). La concentración de la tubulina unida se determinó por sedimentación y se encontró que era típicamente 80%-90% del total. La concentración de sitios de unión de taxoide se determinó por adición de concentraciones crecientes de microtúbulos entrecruzados a Flutax-2 5 μ M en

el tampón GAB-GDP, sedimentación (Díaz, J. F., et al.), 50.000 rpm en un rotor Beckman TLA 120 a 25°C) y medición espectrofotométrica de Flutax-2. Se observó que las preparaciones de microtúbulos entrecruzados unían 0,75 +/- 0,05 de Flutax-2 por tubulina total (es decir, como mínimo el 95% de la tubulina unida era activa uniendo este ligando). Las mediciones de control utilizando ³H-paclitaxel y centelleo líquido dieron valores similares a Flutax-2. Una vez que se determinaron los valores de anisotropía de Flutax unido a microtúbulo y libre, el número de sitios pudo también determinarse por valoración de soluciones diluidas de microtúbulos entrecruzados con Flutax-2 (véase mas abajo). La concentración de sitios de unión de taxoides de las preparaciones de microtúbulos entrecruzados resultó estable bajo nitrógeno líquido, decayendo a velocidades comprendidas entre 0,02 y 0,05 día⁻¹ a 4°C (vidas medias de cinco y dos semanas respectivamente). Se utilizaron los microtúbulos entrecruzados dentro de una vida media a partir de la preparación. Una micrografía de fluorescencia de estos microtúbulos con Flutax-2 se muestra en la Fig.1.

3. Mediciones de espectroscopia de fluorescencia y anisotropía.

Se obtuvieron espectros de fluorescencia corregidos con un instrumento Fluorolog-3-221 de recuento de fotones (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia), con un ancho de banda de emisión de 5nm y excitación de 1µm, a 25°C. Las mediciones fluorométricas de concentración se realizaron con un espectrofluorómetro Shimadzu RF-540. Los espectros de anisotropía y las mediciones se recogieron en el modo formato-T de Fluorolog con excitación polarizada verticalmente y se corrigieron por la sensibilidad de cada canal con excitación polarizada horizontalmente (Lackowicz J.R.). Las mediciones múltiples de anisotropía, se realizaron con un lector de microplaca PolarStar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania) a 25°C. Las soluciones se excitaron con 200 pulsos de luz polarizada verticalmente (filtro de paso de banda 485-P, 480-492nm) y la emisión se analizó simultáneamente con filtros de polarización vertical y horizontal (paso de banda 520-P, 515-550nm). La sensibilidad de los dos canales se ajustó para dar el valor de anisotropía de Flutax-2 libre (0,055, polarización 0,080; tampón GAB a 25°C) en cavidades que contenían Flutax-2 y no microtúbulos. Los valores de blancos de pocillos

con microtúbulos y sin Flutax-2 se sustrajeron de los valores de intensidad de fluorescencia (los blancos representaron típicamente menos del 4% de la medición).

4. Unión de Flutax a microtúbulos.

- 5 Se valoró primero Flutax-2 (50nM) con concentraciones crecientes de sitios de unión proporcionados por microtúbulos entrecruzados, en tampón GAB a 25C. La fracción de Flutax-2 unido es:

$$[F]_b / [F]_0 = (r - r_{\min}) / (r_{\max} - r_{\min}) \quad [1]$$

- donde $[F]_b$ y $[F]_0$ son concentraciones totales y unidas de Flutax-2
10 respectivamente, r es anisotropía de fluorescencia medida con el espectrofluorómetro, el valor de r_{\min} es 0,055 y el valor de r_{\max} era un parámetro ajustable. Suponiendo una unión uno a uno, la concentración de sitios de unión libre $[S]$ es:

$$[S] = [S]_0 - [F]_b \quad [2]$$

- 15 y se aplica la siguiente expresión:

$$r = r_{\min} + (r_{\max} - r_{\min}) K_b [S] / (1 + K [S]) \quad [3]$$

- La ecuación 3 se aplicó iterativamente para ajustar los datos r vs $[S]$, usando valores de partida diferentes de r_{\max} en las ecuaciones 1 y 2, con un programa basado en el algoritmo de Marquardt, de lo que se obtuvo el valor mejor fijado
20 $r_{\max} = 0,29$. Las mediciones de control con sitios de unión de microtúbulos bloqueados por 10 μ M paclitaxel dieron valores r muy cercanos a r_{\min} , dentro de un intervalo $[S]_0$ de 0 a 100 nM. Los microtúbulos entrecruzados (50-100nM de tubulina total) se valoraron después con concentraciones conocidas de Flutax-2. La unión se determinó como:

$$25 \quad [F]_b / [T]_0 = [F]_0 (r - r_{\min}) / [T]_0 (r_{\max} - r_{\min}) \quad [4]$$

donde $[T]_0$ es la concentración de tubulina total, y r_{\max} y r_{\min} tienen los valores determinados previamente. La concentración de Flutax-2 libre es:

$$[F] = [F]_0 - [F]_b \quad [5]$$

La ecuación de unión para sitios independientes

$$30 \quad [F]_b / [T]_0 = n K_b [F] / (1 + K_b [F]) \quad [6]$$

se ajustó iterativamente a los datos con un programa basado en el algoritmo de Marquardt, con el fin de obtener los mejores valores fijados de n , el número de

sitios de unión de Flutax-2 por tubulina total, y K_b , y la constante de equilibrio de unión. Cuando se repitieron estos procedimientos usando el lector de placa de polarización, en vez del espectrofluorómetro, se obtuvieron unos valores r_{\max} de 0,245 (con placas Costar 3599) y 0.27 (con placas negras Nunc 267342) y valores K_b y n dentro del error experimental.

5. Mediciones de unión de ligando al sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos por desplazamiento de Flutax-2.

Estas mediciones competitivas se realizaron con el lector de polarización en placa. Una solución de concentraciones conocidas de sitios de unión de microtúbulo y Flutax-2, ambas próximos a 50nM, en tampón GAB-GDP se preparó reciente a partir de las reservas concentradas de microtúbulos entrecruzados y Flutax-2. Se dispensó en alícuotas de 200 μ L (volumen final) a temperatura ambiente en placas con 96 cavidades (Costar cat. n° 3599, no se utilizaron las cavidades de los bordes). Las placas se seleccionaron comprobando que Flutax-2 permanecía en solución, en vez de adsorberse al poliestireno, midiendo los contenidos de las cavidades en el espectrofluorómetro (recuperación del 90%). Los ligandos a ensayar se añadieron en volúmenes pequeños de DMSO (concentración de DMSO final 2% v/v) para hacer las concentraciones duplicadas deseadas. También se comprobó que el paclitaxel no se adsorbía a la placa durante el ensayo, empleando ^3H -Paclitaxel y un contador de centelleo. Las cavidades sin proteína y sin Flutax-2 se incluyeron para mediciones de calibrado y de fondo respectivamente (véase las medidas de anisotropía más arriba). Las placas se agitaron por rotación durante 10 minutos y se midieron 2 veces dentro de 30-90 minutos después de equilibrado a 25°C en el lector de microplaca. Los datos de anisotropía de Flutax-2 se calcularon con el software de evaluación (BMG) y se trazaron versus la concentración total de competidor.

Con el fin de medir la afinidad de unión de un ligando (L) que desplaza el ligando de referencia Flutax-2 de su sitio de unión de microtúbulo (S), se asumió estequiometría unitaria, determinándose la unión fraccionaria de Flutax-2 a partir de la anisotropía como

$$[F]_b / [S]_0 = [F]_0 (r - r_{\min}) / [S]_0 (r_{\max} - r_{\min}) \quad [8]$$

y se aplicaron las siguientes expresiones:

$$K(F) = [SF] / [S][F] \quad [9]$$

$$K(B) = [SB] / [S][B] \quad [10]$$

$$[F] = [F]_0 - [SF] \quad [11]$$

$$5 \quad [L] = [L]_0 - [SL] \quad [12]$$

$$[S] = [S]_0 - [SL] - [SF] \quad [13]$$

Un programa de ordenador personal, que implementaba la solución a las ecuaciones (9-13) a partir de los valores conocidos de $[F]_0, [L]_0, [S]_0$ y $K(F)$, se utilizó para encontrar el mejor valor de ajuste por mínimos cuadrados de la constante de unión de equilibrio del ligando competidor $K(L)$ a los datos $[F]_b/[S]_0$ versus $[L]_0$ (Medrano, F.J., et al.; J.F. Díaz, programa sin publicar Equigra.4). La curva de desplazamiento ajustada se expresó como anisotropía y se trazó junto con los datos (ver Fig. 2).

15 **6. Desplazamiento de 3H Paclitaxel de los microtúbulos por ligandos competidores.**

3H Paclitaxel 100nM, sitios de unión de microtúbulos 100nM y la concentración deseada de competidor en un volumen final de 200 μ L de tampón GAB-GDP que contenía 1 mg mL⁻¹ de albúmina de suero bovino (BSA) y DMSO al 1%, se incubaron durante 30 min. y se centrifugaron 10 min. a 50.000 rpm, 25°C, en tubos de policarbonato en un rotor TLA 100 con una ultracentrífuga TLX (Beckman, Palo Alto, CA). Los sobrenadantes y los tubos que contenían los sedimentos se separaron y se sometieron a recuento con un contador de centelleo líquido. Los datos pudieron tratarse numéricamente de modo similar a la sección de más arriba, sustituyendo Paclitaxel por Flutax-2.

REIVINDICACIONES

1. Método consistente en un ensayo homogéneo para la detección de cualesquiera sustancias antitumorales sustitutivas de paclitaxel en el sitio de unión de paclitaxel de los microtúbulos, caracterizado porque:
 - 5 - se basa en la combinación de una diana y una sonda,
 - se añaden las sustancias a ensayar a una solución de la diana que consiste en microtúbulos y la sonda fluorescente unida a la diana,
 - se determina el desplazamiento de las sustancias competidoras de la interacción de la sonda con la diana mediante la medida del descenso de anisotropía de la variación de intensidad de fluorescencia de la sonda o de la transferencia resonante de energía de la sonda a un aceptor adecuado.
 - 10 - y se identifica un compuesto biomimético de paclitaxel si se observa un descenso de la anisotropía de la fluorescencia de la sonda o mediante el descenso de transferencia resonante de energía de la sonda unida a un ligando.
 - 15
2. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque la diana de este método son microtúbulos ensamblados *in vitro* los cuales se estabilizan mediante entrecruzamiento químico y se conservan indefinidamente
20 mediante diálisis contra un tampón de conservación y criopreservación.
3. Método según las reivindicaciones 1 a la 2 caracterizado porque la sonda de este método son cualesquiera derivados fluorescentes de paclitaxel que se unen específicamente a los microtúbulos, incluyendo entre otros:
25 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel

 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceinsulfonil)-L-alanil]Paclitaxel

 7-O-[N-(4'-tetrametilrodamincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel

30 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-beta-alanil]Paclitaxel

4. Método según las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque puede ser robotizado y porque las medidas se pueden realizar empleando lectores de fluorescencia en placa.
5. 5. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 4 para la identificación de alto rendimiento (HTP) de compuestos antitumorales que actuen sobre el sitio de unión de paclitaxel en los microtubulos, provenientes de fuentes naturales o sintéticas.
6. 6. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 5 para la evaluación de nuevos derivados de taxanos, epotilonas, discodermolida, eleuterobina, sarcodicitina y cualesquiera otros ligandos del sitio de unión de paclitaxel en los microtubulos.
7. 7. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 6 para la evaluación del contenido en dichas sustancias activas de una fuente natural de producción.
8. 8. Uso del método según la reivindicaciones 1 a la 7 para la evaluación de nuevas fuentes para la extracción o preparación de sustancias potencialmente activas a partir de precursores farmacológicamente no activos o semi-activos.
9. 9. Uso del método según la reivindicaciones 1 a la 8 para el desarrollo de herramientas para la realización de ensayos en investigación oncológica y/o biológica relacionadas con los microtubulos celulares.

RESUMEN:**METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS MIMETICOS DE PACLITAXEL.**

Una gran parte de los citostáticos, entre ellos paclitaxel (Taxol ®) y otras
5 substancias recientemente descubiertas que mimetizan sus efectos
antitumorales, tienen como diana los microtúbulos celulares. La presente
invención es un ensayo homogéneo de alto rendimiento, basado en la
utilización de microtúbulos estabilizados y taxoides fluorescentes, para detectar
cualesquiera substancias que puedan sustituir al paclitaxel en su sitio de unión
10 en los microtúbulos, y constituir potencialmente agentes anticancerosos.

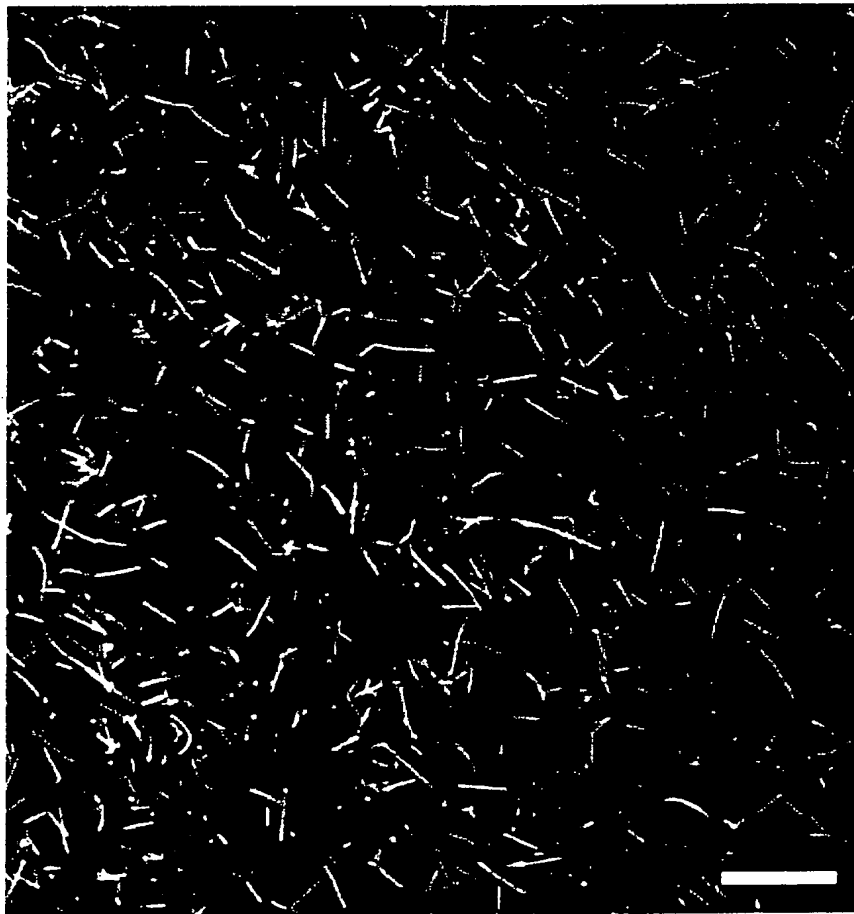
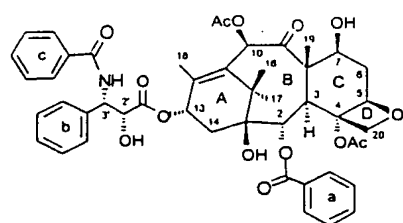
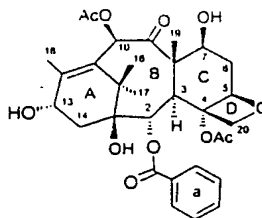


Figura 1

2/2



1 Taxol



2 baccatina III

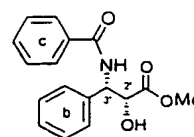
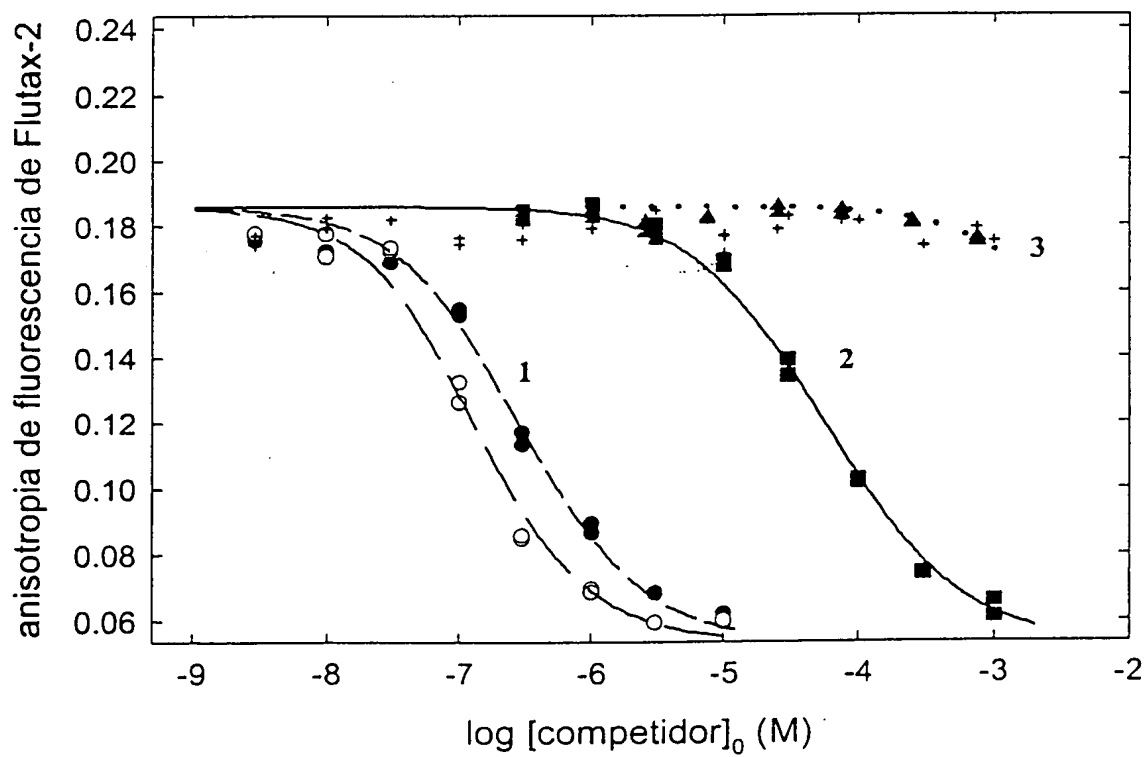
3 ester metilico de la
cadena lateral en C-13

Figura 2

TITLE:

**METHOD OF DETECTING AND ANALYSING PACLITAXEL-MIMETIC
COMPOUNDS**

5

SECTOR OF THE ART:

Pharmaceutical sector. Antitumour agents. High-efficiency
homogeneous test for the detection of substances that can
substitute paclitaxel in its binding site in microtubules
10 and therefore with potential activity as antitumour
agents.

STATE OF THE ART:

Paclitaxel (Taxol ®), a compound much used in
15 chemotherapy of cancer, displays side effects just as
other anticancer agents do. This diterpenoid compound was
originally extracted from the bark of a plant, *Taxus
brevifolia*, a slow-growing species which entailed a
problem of the lack of a cheap and available source of
20 paclitaxel. The paclitaxel currently used is a semi-
synthetic product starting from a precursor extracted
from the leaves of yew trees. Moreover, paclitaxel
displays problems of extreme insolubility. So, although
paclitaxel is a chemotherapy agent with considerable
25 biological activity, the discovery of new sources of
paclitaxel or of mimetic compounds of paclitaxel has a
decisive utility.

Paclitaxel promotes the assembly of $\alpha\beta$ -tubulin in
microtubules by preferential binding to assembled tubulin
30 rather than to unassembled tubulin. Its effect is related
to that of the GTP nucleotide, with important
differences. The GTP binds to one end of the tubulin
dimer making contact with the following dimer along each
protofilament forming the microtubule, while the
35 paclitaxel binds to one side of the of β -tubulin close to

the contact with the following protofilament; in the α -tubulin, the zone corresponding to the binding cavity to paclitaxel is occupied by a loop of the peptide chain (Nogales, E.). The unassembled tubular dimers bind the
5 GTP and the binding site is hidden by the assemblage; while the binding site to paclitaxel exists only in assembled tubulin. The hydrolysis of GTP permits disassemble and regulation of the microtubules systems. Nevertheless, the activation of the tubulin by paclitaxel
10 is permanent stabilising the microtubules. The suppression of the dynamics of cellular microtubules by paclitaxel is a primary cause of the inhibition of cell division and of the death of tumour cells (Jordan, M.A. and Wilson., L.). A number of different natural
15 substances, including epotilones (Bollag, D.M., et al.), discodermolide (Ter Haar, E., et al.), eleuterobine (Long, B.H. et al.) and laulimalide (Mooberry, S.I., et al.) imitate the cytotoxic effects of paclitaxel, apparently becoming bound to its site in the
20 microtubules. Each of these substances was discovered by means of different tests for activities similar to that of paclitaxel. Some patents describe methods for identifying compounds with activities similar to that of paclitaxel. The
25 American patent US-5340724 (Upjohn Co.) describes a method of using paclitaxel-dependent cells (Tax 2-4 CHO) and detecting their growth. The application PCT WO9420134 (Columbia University) provides two monoclonal antibodies produced by two hybridomes which are capable of becoming
30 bound to paclitaxel and to its analogues, as well as their use for determining the presence and quantity of paclitaxel or its biologically active derivatives. Another patent application, PCT WO0056894 (Cytoclonal pharmaceuticals, Inc.), describes the DNA sequences that
35 code the beta tubulin of different species of fungi of

the genus Pestalotiopsis; these purified DNA segments are used for detecting compounds with antitumour activity. Another application, PCT WO 9953295 (California University), consists of a method for the detection of agents that modulate the depolymerisation of microtubules, bringing into contact polymerised microtubules, a protein which depolymerises them and the substances to be tested in the presence of ATP or GTP and detecting the formation of monomers, dimers or oligomers of tubulin by means of different methods such as change of fluorescence (DAPI), centrifugation, etc.

Nevertheless, in contrast with other important biological targets, so far there has not been any standard test for directly detecting and measuring other any ligands capable of replacing paclitaxel in its binding site in the microtubules.

Methods based on luminescence are very useful for these purposes. Fluorescent, hydrosoluble and active derivatives of paclitaxel, bound to an intermediate of alanine in the non-essential position 7 (Souto, A.A., et al.) are specific probes for the binding site of paclitaxel to microtubules (Evangelio, J.A., et al.) These fluorescent taxoids have mainly been used for localising subcellular binding sites of cytotoxic taxoid to microtubules of the pole of the spindle and to centrosomes (Abal, M.A. et al.), as well as for measuring the fast kinetics of binding and of dissociation of the paclitaxel site exposed in microtubules (Diaz, J.F et al.)

The primary objective of this invention is the development of a homogeneous fluorescent test of ligand binding to the paclitaxel site in microtubules, which permits high-efficiency detection of new paclitaxel mimetics. The method is based upon the combination of two components, a target and a probe. The target consists of

microtubules assembled in vitro, which are stabilised by means of chemical cross-linking and conserved in liquid nitrogen. This conservation method is novel. Fluorescent derivatives of paclitaxel, which are specifically bound
5 to the microtubules (patents ES-2121549, ES-2105983, WO-9719938, Consejo Superior de Investigaciones Científicas) (Diaz, J.F., et al.) are used as probe.

The applications of this method are: search for new antitumour agents starting from libraries of natural and
10 synthetic extracts and compounds; evaluation of chemical modifications of series of existing compounds (including paclitaxel, epotilone, discodermolide, euterobine, laulimalide); valuation of content in active taxanes in natural sources; biological and oncological research.

15 DESCRIPTION OF THE INVENTION

Brief description of the invention

The binding site of microtubules to paclitaxel also binds other recently discovered ligands having antitumour
20 activity. In the present invention, a high-efficiency homogeneous test has been designed for the detection of paclitaxel biomimetics based on the displacement of the fluorescent taxoid 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl]paclitaxel of its binding
25 site in diluted solutions of conserved microtubules.

The detection method object of the present invention, and which is claimed, is based on the combination of the two components, the target, which consists of microtubules assembled in vitro, which are stabilised by means of
30 chemical cross-linking and conserved indefinitely frozen in liquid nitrogen until they are used, this method of conserving the microtubules also being claimed in the present invention, and the probe, which consists of the said fluoresceinated derivative of paclitaxel, which is
35 specifically bound to the microtubules.

The method consists of the addition of the substances (non-fluorescent) to test to multiple aliquots of a diluted solution of the target and the probe in multi-well microplates. The substances to test can be compounds of the families of discodermolide, eleuterobine, sarcodicitine, epotilone and paclitaxel. This method can also have application for measuring active paclitaxel-type contents of natural sources and for the high-efficiency detection of new biomimetics of paclitaxel.

10 The probe bound to the target possesses a much greater fluorescence anisotropy value than that of the free probe; displacement by any competitor substances of the interaction of the probe (reference ligand) with the target is detected by means of the drop in fluorescence

15 anisotropy of the probe with a fluorescence polarisation microplate reader. Alternatively, use is made of the drop in resonance energy transfer (RET) of the probe bound to a rhodaminated acceptor ligand, 7-O-[N-(4'-tetramethylrhodamine-carbonyl)-L-alanyl] paclitaxel or

20 the change in intensity of fluorescence of the probe 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl] paclitaxel. This method has application in the development of tools for conducting tests in oncological and/or biological research.

25 Also an object of the present invention is the method for conserving the microtubules indefinitely. This method consists of dialysing the cross-linked microtubules against a conservation buffer and cryopreserving them.

30 **Detailed description of the invention**

With the aim of establishing an effective test of competition based on fluorescence for the binding of ligand to the paclitaxel site in microtubules, the changes in the fluorescent properties of the probe 7-O-

35 [N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonyl)-L-

alanyl]paclitaxel (Flutax-2; 10) on the specific binding to microtubules were investigated. Flutax-2 was preferred to the analogous Flutax-1 with non-fluorated fluorescein, for its superior photostability and acid pK (making the di-anion strongly fluorescent at neutral pH values). Methods of fluorescence anisotropy and of resonance energy transfer (RET) were investigated, along with methods of emission intensity (with Flutax-1). Since the microtubules are bound to paclitaxel and to Flutax with great affinity, low concentrations of binding sites were necessary in order to detect competitors of lower affinity. These binding sites, stabilised by dilution, were provided by gently cross-linked microtubules (see for example: Evangelio, J.A. et al.; Diaz, J.F. et al.)

15 Validation of the probe and target. A) Measurement of the specific binding of Flutax-2 to microtubules by means of fluorescence anisotropy and its cancellation by paclitaxel

The intensity of fluorescence of Flutax-2 changes very little with the binding to microtubules. There is a small change in the excitation maximum from 494nm to 495nm (isosbestic point at 500nm) and a blue shift in emission from 523nm to 520nm (not shown here; isosbestic point at 525nm; Diaz, J.F. et al.). Nevertheless, the fluorescence polarisation of Flutax-2 increases significantly as a result of the binding. The excitation anisotropy spectrum of a 50nM solution of microtubule sites / Flutax-2 was compared with the spectrum of a similar solution in which the binding sites were blocked by an excess of paclitaxel and of free Flutax-2. Both the negative anisotropy of the 329nm band and the positive anisotropy of the lower energy excitation transition (495nm) of the difluoro-fluorescein are specifically increased by the binding of Flutax-2 to microtubules. The anisotropy values determined for the 495nm band (emission 520nm; GAB buffer

containing glycerol, 25°C) were: free Flutax-2 (50nm), $r_{\min} = 0.055$; in the presence of microtubules blocked with paclitaxel, $r = 0.060$; Flutax-2 specifically bound to the microtubules, $r_{\max} = 0.29$ (the last was determined by valuation of 50nm Flutax-2 with growing concentrations of microtubules). These changes are consistent with a strong immobilisation of the fluorophore by the binding. In addition to the anchorage of Flutax-2 via its paclitaxel residue, an interaction of the fluorescein dianion with a cation residue of microtubules, possibly Arg 282 of β -tubulin, has also been proposed (Evangelio, J.A., et al., see Fig. 10 in Diaz, J.F. et al.)

A binding isotherm of Flutax-2 to microtubules, determined on the basis of the change of anisotropy of the ligand, indicates an equilibrium constant of the binding with value $K_b = 11.5 \pm 0.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ in GAB-GDP buffer at 25°C (this is not significantly different from the values previously obtained by centrifugation (Diaz, J.F., et al.)) The binding of Flutax-2 at these concentrations is entirely annulled by 10 μ M paclitaxel.

On the basis of these results, of the observation of the capacity of Flutax-2 to substitute ^3H -paclitaxel in its binding site, and of the previous results discussed in a detailed kinetic study (Diaz, J.F. et al.), Flutax-2 can be considered a genuine probe for the paclitaxel-binding site of microtubules.

Validation of the probe and target. B) Detection of the binding of Flutax-2 to microtubules by means of energy transfer (RET) to another fluorescent taxoid and its cancellation by paclitaxel

The closest distances between binding sites to paclitaxel in β -tubulin sub-units of microtubules are ca. 5.5, 8 and 9.5nm (Nogales, E. et al.), an appropriate interval of distance for RET from fluorescein to fluorophores of rhodamine. The displacement of the donor or acceptor from

its binding sites by another non-fluorescent ligand would suppress emission by the acceptor due to excitation of the donor. The emission spectrum (excitation at 460nm) of binding sites of 50nM microtubules with 10nM Flutax-2 and 40nM Rotax (7-O-[N-(4'-tetramethylrhodamine-carbonyl)-L-alanyl] paclitaxel (Evangelio, A.A. et al.) showed a sensitised emission peak of Rotax, as well as emission of Flutax-2. When the binding sites were blocked with paclitaxel, the emission of fluorescein increased (it did not go out) and changed from 521 to 524nm, while the contribution of rhodamine fell to a level (a shoulder) similar to that of the non-sensitised emission of Rotax at 582nm. This experiment indicated the possibility of detecting a ligand binding to the paclitaxel site by the drop in RET.

Validation of the probe and target. C) Detection of the binding of Flutax-1 to microtubules by means of energy transfer (RET) to another fluorescent taxoid and its cancellation by paclitaxel

Using Flutax-1 it is possible to characterise the displacement by variation of the intensity of fluorescence.

Fluorescent test for detection and evaluation of ligands interacting with the binding site of paclitaxel in microtubules

Using Flutax-2 as a reference probe for the binding site to paclitaxel, the binding of other non-fluorescent ligands which displace Flutax-2 from the microtubules (see Figure 1) can easily be measured by the changes in their own fluorescence properties in a competition test. The change of fluorescence anisotropy, which was analysed in 96-well plates with a microplate reader, was used. Figure 2 shows how the paclitaxel and the docetaxel effectively decrease the fluorescence anisotropy of solutions of 50 nM Flutax-2 / 50 nM microtubule sites.

The numerical analysis of the displacement isotherms (see example) indicated that paclitaxel and docetaxel bind to microtubules with equilibrium binding constants of $(3.7 \pm 1.5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (four determinations) and $(6.0 \pm 2.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (two determinations), respectively, at 25°C. The ratio of affinities of docetaxel to paclitaxel was 2.7 ± 0.3 on the basis of the individual experiments. An affinity of docetaxel twice that of paclitaxel is in accordance with a previous direct determination (Diaz J.F and Andreu, J.M.). The affinity of paclitaxel is of the same order of magnitude as the values previously determined for paclitaxel (Parness J and Horwitz, S.B.), 2-dibenzoyl-2-(m-aminobenzoyl) paclitaxel (Han, Y. et al.) and 3'-N-m-aminobenzamide-3'-N-debenzamide-paclitaxel (Li, Y. et al.). Baccatine III, so far generally considered to be an inactive compound, entirely inhibited the anisotropy of microtubule Flutax-2, though at total concentrations approximately 200 times greater than paclitaxel (see Fig. 1). The analysis of the displacement data indicated that baccatine III is recognised by the paclitaxel binding site of microtubules with an equilibrium constant of $1.5 \pm 0.5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (seven determinations). Baccatine III is equivalent to the taxane ring system, in which the group C-13 OH substitutes the paclitaxel side chain (see chemical structures in Fig. 2). The C-13 side chain has previously been considered as an essential determinant for recognition of paclitaxel. Nevertheless, the methyl ester of the C-13 side chain was, within the limits of its solubility, inactive for displacing Flutax-2. The results indicated an equilibrium constant of less than 10^3 M^{-1} for this analogue of the C-13 side chain separated from the rest of the molecule (see Fig. 2.2, determinations).

In a series of control measurements, the displacement of the interaction of ^3H -paclitaxel with microtubules by

baccatine III and Flutax-2 was evidenced by sedimentation and scintillation count. The results of these measurements (see Example) were compatible with those of fluorescence anisotropy tests, except for an apparent
5 affinity of Flutax-2 seven times lower. This confirmed that baccatine III is recognised by the paclitaxel-binding site of microtubules. Nevertheless, with the aim of having the majority of the radioactive ^3H -paclitaxel tracer in solution, instead of being absorbed into the
10 polycarbonate tube of the table-top ultracentrifuge, it was necessary to include 1 mg mL^{-1} of bovine serum albumin, which binds the paclitaxel (keeping it available for interaction with the microtubules) and also the Flutax-2 (decreasing its apparent affinity). These
15 adsorption processes make it impossible to have any direct rigorous measurement of the affinity of the binding of paclitaxel to microtubules in our hands, and therefore of the affinity of its competitors using paclitaxel as a reference ligand in these diluted tests.
20 The additional disadvantages of the binding tests of ^3H -paclitaxel in comparison with the homogeneous test of the anisotropy of fluorescent taxoid are the operations of centrifugation, separation and radioactive measurement that are required.

25 Use of the fluorescence anisotropy test in microplate in comparison with other methods for mimetic detection of paclitaxel

The fluorescence method for the detection of binding of ligands to the paclitaxel site of microtubules developed
30 in this work constitutes a first homogeneous test for any other substance acting on this important antitumour target. Its simplicity compares favourably with screening methods based on the stabilisation of microtubules (Bollag, D.M., et al., www.cytoskeleton.com) and with the
35 competitive tests using radioactively marked paclitaxel

(above, Bollag, D.M. et al., Diaz, J.F. and Andreu, J.M.) The specific monoclonal antibodies of taxane offer a possibly unsurpassable sensitivity for the determination of drug contents and closely related compounds (Grothaus, P.G. et al; O'Boyle, K.P.; Bicamumpaka, C and Page, M.), nevertheless, they can fail to recognise ligands that are not chemically related to the paclitaxel binding site of the microtubule. Since multiple samples can be easily analysed with the method of polarisation by fluorescence, this test constitutes a useful tool for the evaluation of the affinity of binding of recently designed compounds of the families of discodermolide, eleuterobine, epotilones and paclitaxel. It is also applicable to the measurement of paclitaxel-type active contents of natural sources, and for the high-efficiency investigation of new biomimetics of paclitaxel, in a complementary mode to the cellular explorations for mitotic inhibitors, like those used in the discovery of monastrol (Mayer, T.U. et al.). An interesting property of the fluorescence anisotropy test is its sensitivity for the detection of ligands of medium affinity. This is possible due to the combination of a highly fluorescent taxoid (Flutax-2) with stabilised microtubules, permitting the considerable dilution needed for the effective displacement of the probe through the weakest ligands, which would otherwise not be detected. An example is the detection of baccatine III binding, which provides a new view of the molecular recognition of paclitaxel by microtubules.

BIBLIOGRAPHY

Abal, M.A., Souto, A.A.; Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., Andreu, J.M. and Barasoain (2001) *Cell Motil. Cytosk.* 49, 1-15.

- Andreu, J.M., Perez-Ramirez, B., Gorbunoff, M.J., Ayala, D. and Timasheff, S.N. (1998) *Biochemistry* 37, 8356-8368.
- Bicamumpaka, C. and Page, M. (1998) *J. Immunol. Meth.* 212, 1-7.
- 5 Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Henses, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Diaz, J.F. and Andreu, J.M. (1993) *Biochemistry*, 32, 2747-2755.
- Diaz, J.F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A.A. and Andreu, J.M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 26265-26276.
- 10 Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuña, A.U., Amat-Guerri, F. and Andreu, J.M. (1998) *Cell Motil. Cytoskel.* 39, 73-90.
- Grothaus, P.G., Bignami, G.S., O'Malley, S., Harada, K.E., Byrnes, J.B., Waller, D.F., Raybould, T.J.,
- 15 McGuire, M.T. and Alvarado, B. (1995) *J. Nat. Prod.* 58, 1003-1014.
- Han, Y., Chaudhary, A.G., Chordia, M.D., Sackett, D.L., Perez-Ramirez, B., Kingston, D.G. and Bane, S. (1995) *Biochemistry* 35, 14173-14183.
- 20 Jiminez-Barbero, J., Souto, A.A., Abal, M., Barasoain, I., Evangelio, J.A., Acuña, A.U. Andreu, J.M. and Amat-Guerri, F. (1998) *Bioorg., Med. Chem.* 6, 1857-1863.
- Jordan, M.A. and Wilson, L. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 123-130.
- 25 Lackowitz, J.R. (1999) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer/Plenum, New York, N.Y.
- Li, Y, Edsall, R. Jr., Jagtap, P.G., Kingston, D.G.I. and Bane, S. (2000) *Biochemistry* 39, 616-623.
- Long, B.H., Carboni, J.M., Wasserman, A.J., Cornell,
- 30 L.A., Casazza, A.M., Jensen, P.R., Lindel, T., Fenical, W. and Fairchild, C.R. (1998) *Cancer Res.* 58, 1111-1115.
- Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L., and Mitchison, T.J. (1999) *Science* 286, 971-974.

- Medrano, F.J., Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J. and Timasheff, S.N. (1991) *Biochemistry* 30, 3770-3777.
- Mooberry, S.I. Tien, G., Hernandez, A.H., Plubrukam, A. and Davidson, B.S. (1999) *Cancer Res.* 59, 653-660.
- 5 Nogales, E (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277-302.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. and Downing, K.H. (1999) *Cell*, 96, 79-88.
- Nogales, E., Wolf, S.G. and Downing, K. (1998) *Nature* 391, 199-203.
- 10 O'Boyle, K.P., Wang, Y, Schwarz, E.L., Regl, D.L., Eizig, A., Dutcher, J.P., Wiernik, P.H. and Horwitz, S.B. (1997) *Cancer* 79, 1022-1030.
- Parness, J. and Horwitz, S.B. (1981) *J. Cell Biol.* 91, 479-487.
- 15 Souto, A.A., Acuña, A.U., Andreu, M.J., Barasoain, I., Abal, M. and Amat-Guerri, F. (1995) *Angew. Chem. Ind. Ed. Engl.* 34, 2710-2712.
- Ter Haar, E., Kowalsky, R.J., Lin, C.M., Longley, R.E., Gunasekera, S.P., Rosenkrantz, H.S. and Day, B.W. (1996)
- 20 *Biochemistry* 35, 243-250.

DETAILED DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGURE 1. A fluorescence micrograph of a typical reaction mixture used in this invention, which consists of stabilised microtubules (taxoid sites 100 nM) and Flutax-2 fluorescent taxoid (100nM). The bar indicates 10µm.

25

FIGURE 2. Competition isotherms of ligands bound to the paclitaxel site of microtubules in GAB-GDP buffer at 25°C. The fluorescence anisotropy of multiple solutions of 50nM Flutax-2 and binding sites of 50nM microtubules with various concentrations of competitors were measured in duplicate, using a microplate reader. The solid circles, paclitaxel (1); the empty circles, docetaxel;

30

35

and the squares, baccatine III (2); and triangles, methyl ester of the C-13 side chain of paclitaxel (3); the crosses, controls corresponding to DMSO 1% (v/v) without ligand. In this test, each competition curve starts with an anisotropy value corresponding to two thirds of bound Flutax-2 molecules, which are progressively reduced by the competitor that substitutes Flutax-2 in the binding sites. The equilibrium binding constant of Flutax-2 is $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. The lines 1 (short broken) and 2 (continuous) correspond to best fits for the binding of paclitaxel and baccatine to the same site with equilibrium constant values of $K = 3.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ and $K = 1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectively; the long broken line is the fit of the data for docetaxel, $K = 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$; the line of points passing through the data for the side chain methyl ester is a simulation of a binding of low affinity binding with $K = 7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ (observe that these last data are similar to those for the controls).

20 **EXAMPLE OF EMBODIMENT OF THE INVENTION**

1. Taxoids. Fluorescent probe.

Standard concentrated solutions were prepared and were kept at -20°C in a dry atmosphere. The paclitaxel (from the National Cancer Institute, Bethesda, MD) was measured spectroscopically at 273nm following dilution in methanol, using an extinction coefficient of $1,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Diaz, J.F. and Andreu, J.M.) ^3H -paclitaxel (4 Ci mmol^{-1}) was obtained from Moravek Biochemicals (Brea, CA), Docetaxel (Taxotere) was supplied by Rhône-Poulenc Rorer (Antony, France). Baccatine III was obtained from Sigma; it was found to be free of impurities by means of HPLC (a 20-80% gradient of acetonitrile in 0.05% of aqueous trifluoroacetic acid in a C-18 column, monitored at 228nm). An extinction coefficient of baccatine III determined approximately was $900 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (273nm,

methanol). Baccatine III was soluble at the concentrations used in 10mM sodium phosphate, 1mM ethyleneglycol bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetracetic acid (EGTA), 0.1mM GTP, 6mM $MgCl_2$, 3.4 M glycerol, (GAB buffer) pH 6.5 with DMSO at 1%. The methyl ester of the C-13 side chain of paclitaxel was supplied by E. Baloglu and D.G.I. Kingston of the Virginia Polytechnic Institute (Blacksburg, VA). The molar absorptivity of this compound is around $750\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 273nm (absorption queue, methanol) and was soluble at 0.75mM in 1% GAB-DMSO buffer.

Observe that the added 273nm absorptivities of baccatine III and the methyl ester of the side chain were approximately that of paclitaxel. F. Amat-Guerri of the Instituto de Química Orgánica, CSIC (Madrid, Spain) supplied the fluorescent probe Flutax-2; its purity was checked with HPLC and its concentration was determined spectrophotometrically with 0.5% sodium dodecyl sulphate (SDS) at neutral pH, using an extinction coefficient of $49,100\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ at 496nm (Diaz, J.F. et al.).

2. Target: cross-linked microtubules.

Tubulin from bovine brain was purified and stored, and its concentration was measured as has been described (Andreu, J.M. et al.). Prior to its use it was balanced in 10mM sodium phosphate, 1mM EGTA, 0.1mM GTP, 3.5M glycerol pH 6.8, with a Sephadex G-25 gravity column used cold, and it was centrifuged cold for 10 min at 50,000 in a TLA 100.4 rotor (Beckman) cold. The $50\mu\text{M}$ tubulin was made 6mM in $MgCl_2$ (in other words, glycerol assembly buffer GAB, final pH 6.5) and 1mM GTP, it was assembled in microtubules at 37°C and these were gently cross-linked with 20mM glutaraldehyde, the reaction being stopped with NaBH_4 as has been described (Diaz, J.F. et al.) These cross-linked microtubules have the same

specificity, kinetics and stoichiometry for binding to Flutax-2 as the uncross-linked controls, they have a normal morphology under the electron microscope (Diaz, J.F. et al.). The cross-linked microtubules were dialysed
5 against GAB-0.1 mM nucleotide (GTP or GDP) for more than 16h, cold, in dialysis cassettes (Pierce) and were conserved frozen drop by drop in liquid nitrogen, or at 4°C with 0.05% of sodium azide. This conservation method for the cross-linked microtubules by means of dialysis
10 against a conservation and cryopreservation buffer is claimed in the present invention.

Their concentration of total tubulin was measured after diluting them in 1% SDS using an extinction coefficient of $107,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 275nm (Diaz, J.F. and Andreu, J.M.).
15 The concentration of bound tubulin was determined by sedimentation and it was found that it was typically 80-90% of the total. The concentration of binding sites of taxoid was determined by addition of growing concentrations of microtubules cross-linked to $5 \mu\text{M}$
20 Flutax-2 in the GAB-GDP buffer, sedimentation (Diaz, J.F. et al., 50,000 rpm in a Beckman TLA 120 rotor at 25°C) and spectrophotometric measurement of Flutax-2. It was observed that the preparations of cross-linked microtubules bound 0.75 ± 0.05 of Flutax-2 per total
25 tubulin (in other words, a minimum of 95% of the bound tubulin was active binding this ligand). The control measurements using ^3H -paclitaxel and liquid scintillation gave values similar to Flutax-2. Once the anisotropy values of Flutax bound to microtubule and free were
30 determined, the number of sites could also be determined by valuation of diluted solutions of microtubules cross-linked with Flutax-2 (see further below). The concentration of binding sites of taxoids of the preparations of cross-linked microtubules turned out to
35 be stable in liquid nitrogen, decaying at speeds between

0.02 and 0.05 day⁻¹ at 4°C (mean lives of five and two weeks respectively). The cross-linked microtubules were used within one average life starting from the preparation. A fluorescence micrograph of these
5 microtubules with Flutax-2 is shown in Fig. 1.

3. Spectroscopic measurements of fluorescence and anisotropy.

Fluorescence spectra were obtained corrected with a
10 Fluorolog-3-221 photon count instrument (Jobin Yvon-Spex, Longlumeau, France), with an emission bandwidth of 5nm and excitation of 1μm at 25°C. The fluorometric measurements of concentration were made with a Shimadzu RF-540 spectrofluorometer. The anisotropy spectra and
15 measurements were gathered in the Fluorolog format-T mode with vertically polarised excitation and were corrected by the sensitivity of each channel with horizontally polarised excitation (Lackowitz, J.R.). The multiple measurements of anisotropy were made with a PolarStar
20 microplate reader (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) at 25°C. The solutions were excited with 200 pulses of vertically polarised light (band-pass filter 485-P, 480-492nm) and the emission was simultaneously analysed with vertical and horizontal polarisation
25 filters (band-pass 520-P, 515-550nm). The sensitivity of the two channels was adjusted in order to give an anisotropy value of free Flutax-2 (0.055, polarisation 0.080; GAB buffer at 25°C) in wells that contained Flutax-2 and not microtubules. The values of well blanks
30 with microtubules and without Flutax-2 were subtracted from the values of fluorescence intensity (the blanks typically represented less than 4% of the measurement).

4. Binding of Flutax to microtubules

First of all, Flutax-2 (50μM) was valuated with growing
35 concentrations of binding sites provided by cross-linked

microtubules, in GAB buffer at 25C. The fraction of bound Flutax-2 was:

$$[F]_b/[F]_0 = (r - r_{\min}) / (r_{\max} - r_{\min}) \quad [1]$$

where $[F]_b$ and $[F]_0$ are total and bound concentrations of Flutax-2 respectively, r is fluorescence anisotropy measured with the spectrofluorometer, the value of r_{\min} is 0.055 and the value of r_{\max} was an adjustable parameter. Assuming a one to one binding, the concentration of free binding sites $[S]$ is:

$$[S] = [S]_0 - [F]_b \quad [2]$$

and the following expression is applied:

$$r = r_{\min} + (r_{\max} - r_{\min}) K_0 [S] / (1 + K[S]) \quad [3]$$

Equation 3 was iteratively applied in order to fit the data r vs. $[S]$ using different starting values of r_{\max} in equations 1 and 2, with a program based on the Marquardt algorithm, from which the best fixed value $r_{\max} = 0.29$ was obtained. The control measurements with binding sites of microtubules blocked by 10 μ M paclitaxel gave values of r very close to r_{\min} , within an $[S]_0$ interval from 0 to 100 nM. The cross-linked microtubules (50-100nM of total tubulin) were afterwards valued with known concentrations of Flutax-2. The binding was determined as:

$$[F]_b/[T]_0 = [F]_0 (r - r_{\min}) / [T]_0 (r_{\max} - r_{\min}) \quad [4]$$

where $[T]_0$ is the concentration of total tubulin and r_{\max} and r_{\min} have the previously determined values. The concentration of free Flutax-2 is:

$$[F] = [F]_0 - [F]_b \quad [5]$$

The binding equation for independent sites

$$[F]_b/[T]_0 = n K_b [F] / (1 + K_b [F]) \quad [6]$$

was iteratively fitted to the data with a program based on the Marquardt algorithm in order to obtain the best fixed values of n , the number of binding sites of Flutax-2 per total tubulin, and K_b , and the binding equilibrium constant. When these procedures are repeated using the polarisation plate reader, instead of spectrofluorometer,

r_{\max} values of 0.245 (with Costar 3599 plates) and 0.27 (with Nunc 267342 black plates) were obtained, with values of K_b and n within experimental error.

5 **5. Measurements of ligand binding to the paclitaxel binding site of microtubules by displacement of Flutax-2.**

These competitive measurements were made with the polarisation plate reader. A solution of known concentrations of binding sites of microtubule and
10 Flutax-2, both close to 50nM, in GAB-GDP buffer, was freshly prepared starting from the concentrated reserves of cross-linked microtubules and Flutax-2. It was dispensed in aliquots of 200 μ L (final volume) at room temperature in 96-well plates (Costar cat. No. 3599, the
15 wells at the edges were not used). The plates were selected checking that Flutax-2 remained in solution instead of being absorbed onto the polystyrene, measuring the contents of the wells in the spectrofluorometer (90% recovery). The ligands to test were added in small
20 volumes of DMSO (concentration of final DMSO 2% v/v) in order to make the desired duplicated concentrations. A check was also made that the paclitaxel was not adsorbed onto the plate during the test, using ^3H -paclitaxel and a scintillation counter. The wells without protein and
25 without Flutax-2 were included for calibration and background measurements respectively (see anisotropy measurements, above). The plates were stirred by rotation for 10 minutes and were measured twice within 30-90 minutes following balancing at 25°C in the microplate
30 reader. The anisotropy data of Flutax-2 was calculated with the evaluation software (BMG) and was traced against the total concentration of the competitor.

With the aim of measuring the binding affinity of a ligand (L) which displaces the reference ligand Flutax-2
35 from its microtubule binding site (S), unitary

stoichiometry was assumed, with the fractional binding of Flutax-2 starting from the anisotropy being determined as

$$[F]_b/[S]_0 = [F]_0 (r - r_{\min})/[S]_0 (r_{\max} - r_{\min}) \quad [8]$$

and the following expressions were applied

5 $K(F) = [SF]/[S][F] \quad [9]$

$$K(B) = [SB]/[S][B] \quad [10]$$

$$[F] = [F]_0 - [SF] \quad [11]$$

$$[L] = [L]_0 - [SL] \quad [12]$$

$$[S] = [S]_0 - [SL] - [SF] \quad [13]$$

10 A personal computer program, which implemented the solutions to equations (9-13) starting from the known values of $[F]_0$, $[L]_0$, $[S]_0$ and $K(F)$ was used to find the best value of fit by means of least squares of the equilibrium binding constant of the competitor ligand
15 $K(L)$ to the data $[F]_b/[S]_0$ versus $[L]_0$ (Medrano, F.J et al.; J.F. Diaz, unpublished program Equigra 4). The fitted displacement curve was expressed as anisotropy and traced together with the data (see Fig. 2).

20 **6. Displacement of 3H paclitaxel of the microtubules by competitor ligands**

100nM 3H paclitaxel, binding sites of 100nM microtubules and the desired concentration of competitor in a final volume of 200 μ L of GAB-GDP buffer which contained 1 mg mL⁻¹
25 of bovine serum albumin (BSA) and 1% DMSO were incubated for 30 min and centrifuged for 10 minutes at 50,000 rpm, 25°C, in polycarbonate tubes in a TLA 100 rotor with a TLX centrifuge (Beckman, Palo Alto, CA). The supernatant fractions and the tubes which contained the sediments
30 were separated and subjected to a count with a liquid scintillation counter. The data were able to be numerically processed in a manner similar to the above section, replacing paclitaxel by Flutax-2.

CLAIMS

1. Method consisting of a homogeneous test for the detection of any antitumour substances substitutive of paclitaxel in the paclitaxel binding site of microtubules, characterised in that
 - it is based on the combination of a target and a probe,
 - the substances to test are added to a solution of the target which consists of microtubules and the fluorescent probe bound to the target,
 - the displacement of the competitor substances of the interaction of the probe with the target is determined by means of measuring the drop in anisotropy in the variation of intensity of fluorescence of the probe or of the resonance energy transfer of the probe to a suitable acceptor,
 - and a biomimetic compound of paclitaxel is identified if a drop in the anisotropy of the fluorescence of the probe is observed or by means of the drop in resonance energy transfer to the probe bound to a ligand.
2. Method in accordance with claim 1, characterised in that the target of this method are microtubules assembled *in vitro* which are stabilised by means of chemical cross-linking and are indefinitely conserved by means of dialysis against a conservation and cryopreservation buffer.
3. Method in accordance with claims 1 and 2, characterised in that the probe of this method is any fluorescent derivative of paclitaxel that is specifically bound to microtubules, including among others

7-O- [N- (2,7-dfluoro-4'-fluoresceincarbonyl) -L-
alanyl]paclitaxel,
7-O- [N- (2,7-dfluoro-4'-fluoresceinsulphonyl) -L-
alanyl]paclitaxel,
5 7-O- [N- (4'-tetramethylrhodaminreacarbonyl) -L-
alanyl]paclitaxel,
7-O- [N- (2,7-dfluoro-4'-fluoresceincarbonyl) -L-beta-
alanyl]paclitaxel.

- 10 4. Method in accordance with claims 1 to 3, characterised
in that it can be robotised and in that the
measurements can be made using fluorescence plate
readers.
- 15 5. Method in accordance with claims 1 to 4 for the high-
efficiency (HTP) identification of antitumour
compounds acting on the binding site of paclitaxel in
the microtubules, deriving from natural or synthetic
sources.
- 20 6. Use of the method in accordance with claims 1 to 5 for
the evaluation of new derivatives of taxanes,
epotilones, discodermalide, eleuterobine,
sarcodicitine and any other binding site ligands of
paclitaxel in the microtubules.
- 25 7. Use of the method in accordance with claims 1 to 6 for
the evaluation of the content of those active
substances in a natural production source.
- 30 8. Use of the method in accordance with claims 1 to 7 for
the evaluation of new sources for the extraction or
preparation of potentially active substances starting
from pharmacologically non-active or semi-active
precursors.
- 35 9. Use of the method in accordance with claims 1 to 8 for
the development of tools for conducting of tests in
oncological and/or biological research related to
cellular microtubules.

ABSTRACT:

**METHOD OF DETECTING AND ANALYSING PACLITAXEL-MIMETIC
COMPOUNDS**

5

10 A large part of cytostatics, among them paclitaxel (Taxol
its antitumour effects, have cellular microtubules as
their target. The present invention is a high-efficiency
homogeneous test based on the use of stabilised
microtubules and fluorescent taxoids for detecting any
substances that can substitute paclitaxel in its binding
site in microtubules, and constituting potentially
15 anticancerous agents.

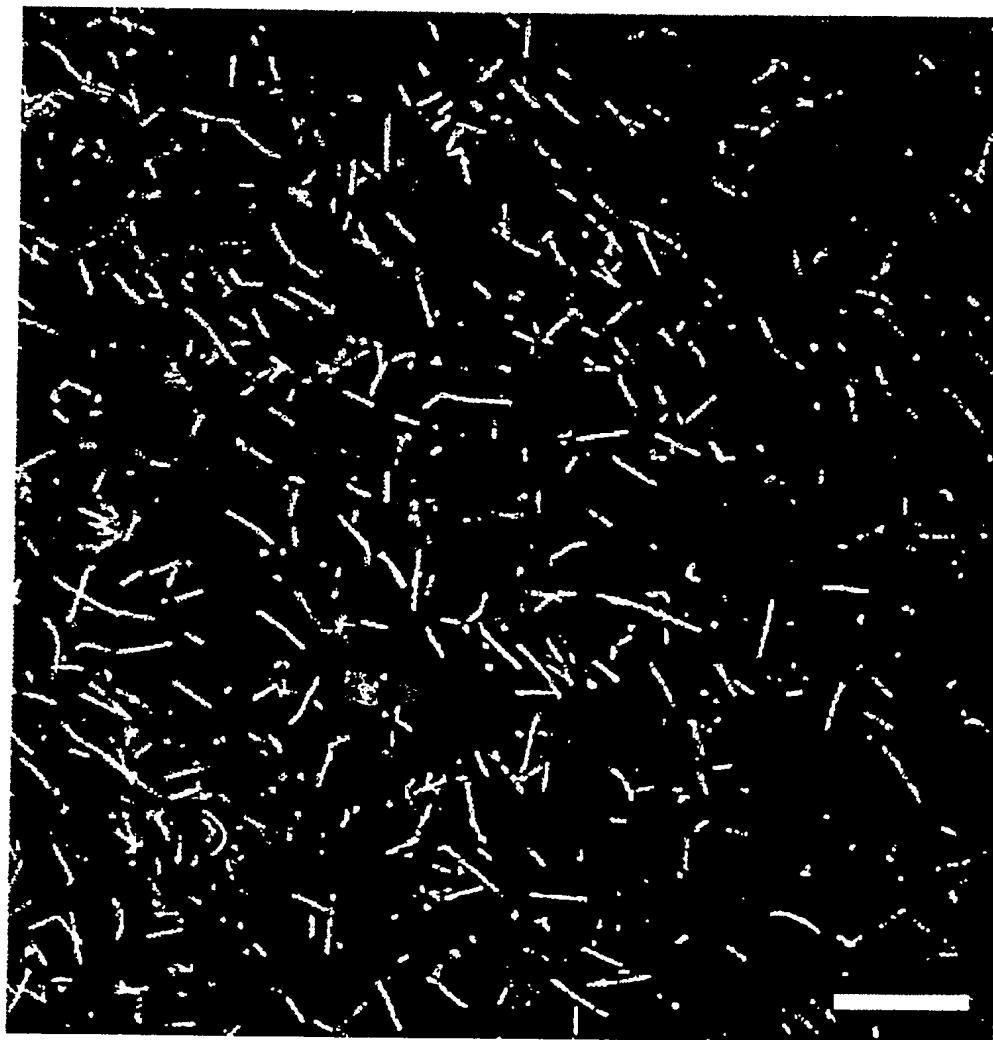
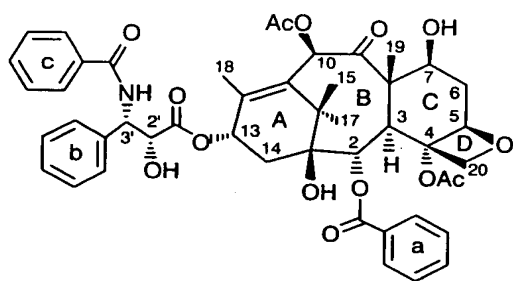
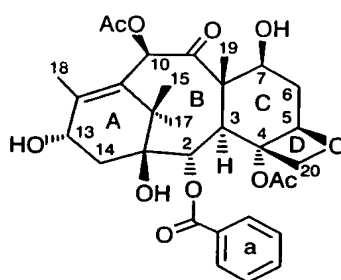


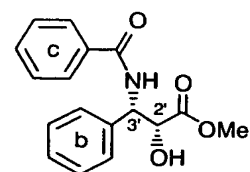
FIG. 1



1 Taxol



2 baccatine III



3 methyl ester of the side chain on C-13

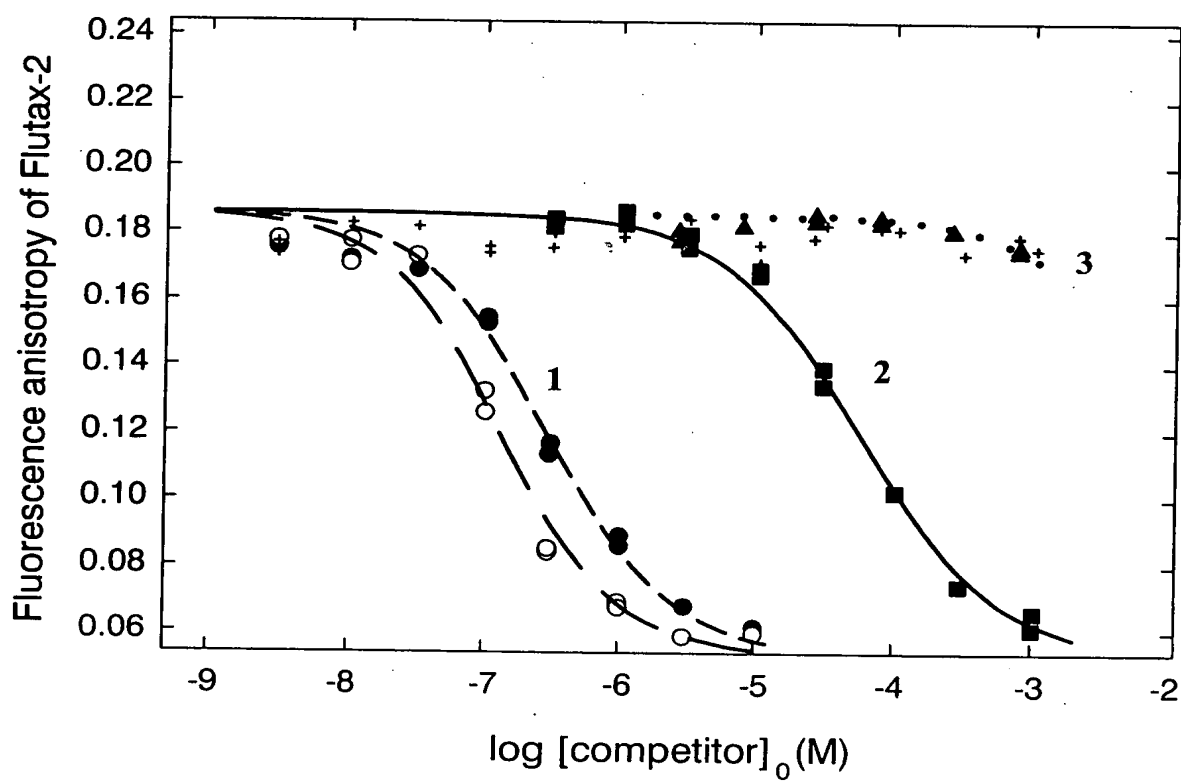
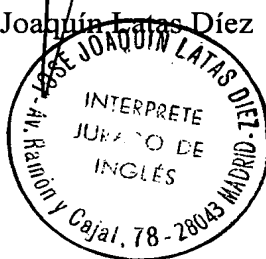


FIG. 2

DE
ES
70

CERTIFICACION	CERTIFICATION
Don José Joaquín Latas Díez, interprete jurado de lengua inglesa, certifica que la que antecede es traducción fiel y completa a lengua inglesa de un documento redactado en castellano.	Mr. José Joaquín Latas Díez, sworn translator of the English language certifies, that the preceding translation is a true and complete version into English of a document written in Spanish.
En Madrid, a 24 Septiembre 2007	Madrid, on the 24 Septiembre 2007

José Joaquín Latas Díez



PCTORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina InternacionalSOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C07D 305/14, 407/12, A61K 49/00, 41/00		A1	(11) Número de publicación internacional: WO 97/19938
		(43) Fecha de publicación internacional:	5 de Junio de 1997 (05.06.97)
(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00231		Madrid (ES). BARASOAIN BLASCO, M ^a Isabel [ES/ES]; Centro Investigaciones Biológicas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES). ABAL, Miguel [ES/ES]; Centro Investigaciones Biológicas, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Velázquez, 144, E-28006 Madrid (ES).	
(22) Fecha de la presentación internacional: 29 de Noviembre de 1996 (29.11.96)		(74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro ; Consejo Superior Investigaciones Científicas, Serrano, 113, E-28006 Madrid (ES).	
(30) Datos relativos a la prioridad: P 9502361 29 de Noviembre de 1995 ES (29.11.95) P 9602522 29 de Noviembre de 1996 ES (29.11.96)		(81) Estados designados: CA, JP, MX, NO, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo I/S): CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).		Publicada Con informe de búsqueda internacional.	
(72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): AMAT GUERRI, Francisco [ES/ES]; Instituto Química Orgánica General, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). SOUTO, Andre [ES/ES]; Instituto Química Orgánica General, Consejo Superior Investigaciones Científicas, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). ACUNA FERNANDEZ, Alberto Ulises [ES/ES]; Instituto Química Física Rocasolano, Serrano, 119, E-28006 Madrid (ES). ANDREU MORALES, José Manuel [ES/ES]; Centro Investigaciones Biológicas, Velázquez, 144, E-28006			
(54) Title: FLUORESCENT DERIVATIVES OF PACLITAXEL AND DOCETAXEL WITH ANTINEOPLASTIC ACTIVITY. METHOD FOR PRODUCING THEM AND THEIR APPLICATIONS			
(54) Título: DERIVADOS FLUORESCENTES DE PACLITAXEL Y DOCETAXEL CON ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA. METODO PARA OBTENERLOS Y SUS APLICACIONES			
(57) Abstract <p>Intensively fluorescent derivatives have been synthesized from a substance used at present as anticancer (chemotherapy) agent, against ovarian and mammal tumors, and other tumors. Said derivatives enable to visualize the cellular target of said drug, since the derivatization does not modify the biological activity. There is no existing compound which has the solubility, activity and fluorescence characteristics of the compounds disclosed in the present invention. Said derivatives may be used as fluorescence microscopy colorants specific to microtubules of the cytoskeleton in cells and other living organisms. Said derivatives have many applications in the analysis of the cell anatomy and in clinical diagnosis.</p>			
(57) Resumen <p>Se ha sintetizado derivados intensamente fluorescentes de una sustancia utilizada actualmente como anticancerígeno (quimioterapia), contra tumores de ovario y mama entre otros. Estos derivados permiten visualizar la diana celular de dicho fármaco, ya que la derivatización no ha modificado la actividad biológica. No existe ningún compuesto que presente las características de solubilidad, actividad y fluorescencia de los aquí descrito. Dichos derivados se pueden usar como colorantes de microscopía de fluorescencia específicos de los microtúbulos del citoesqueleto en células y otros organismos vivos. Estos derivados tienen múltiples aplicaciones en el análisis de la anatomía celular y en el diagnóstico clínico.</p>			

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	GB	Reino Unido	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	México
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Níger
BB	Barbados	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BF	Bélgica	HU	Hungría	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BG	Bulgaria	IT	Italia	PL	Polonia
BJ	Benin	JP	Japón	PT	Portugal
BR	Brasil	KE	Kenya	RO	Rumania
BY	Bielarús	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CA	Canadá	KP	República Popular	SD	Sudán
CF	República Centroafricana		Democrática de Corea	SE	Suecia
CG	Congo	KR	República de Corea	SG	Singapur
CH	Suiza	KZ	Kazajistán	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LR	Liberia	SZ	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	LT	Lituania	TD	Chad
CZ	República Checa	LU	Luxemburgo	TG	Togo
DE	Alemania	LV	Letonia	TJ	Tayikistán
DK	Dinamarca	MC	Mónaco	TT	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	MD	República de Moldova	UA	Ucrania
ES	España	MG	Madagascar	UG	Uganda
FI	Finlandia	ML	Mali	US	Estados Unidos de América
FR	Francia	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistán
GA	Gabón	MR	Mauritania	VN	Viet Nam

1. Título

Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones

5 2. Sector de la técnica

1) farmacéutico-bioquímico; 2) compuestos para el análisis de la diana celular de los fármacos anticancerosos paclitaxel y docetaxel, y para la terapia anticancerosa directa o fotodinámica.

10 3. Estado de la técnica

Paclitaxel (o taxol, marca registrada por Bristol-Myers Squibb), un diterpenoide natural que se extrae de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, y su análogo de síntesis docetaxel (10-desacetil-3'-(N-desbenzoil)-3'-(N-tertbutiloxicarbonil)paclitaxel, o taxotere, marca registrada por Rhône-Poulenc) están actualmente entre las más prometedoras drogas anticancerosas debido a su capacidad para estabilizar los microtúbulos del citoesqueleto y, por consiguiente, para inhibir la división celular. Sin embargo, ambos fármacos presentan varios inconvenientes en su utilización en terapia humana, principalmente una solubilidad muy reducida en el plasma sanguíneo, así como

20 varios efectos secundarios. Un buen número de laboratorios implicados en la lucha contra el cáncer dirigen actualmente su atención a la obtención de nuevos fármacos anticancerosos por modificación química de estas dos moléculas de taxanos, así como a la aclaración de su mecanismo de acción bioquímica. Algunos de los inventores de la presente patente han descrito las estructuras de los microtúbulos formados por la acción de paclitaxel (Andreu y cols., *J. Mol. Biol.* 1992, 226, 169 y *J. Biol. Chem.* 1994, 50, 31785), el ensamblaje de GDP-tubulina en presencia de taxoides y la relación entre la reacción de unión de paclitaxel y la de formación de microtúbulos (Díaz y cols., *Biochemistry* 1993, 32, 2747 y 10067).

30 Para los investigadores que estudian los microtúbulos celulares y el mecanismo de acción de estas drogas sería de inmediata utilidad disponer de un derivado luminiscente (ya que ni paclitaxel ni docetaxel lo son) que, además,

fuese suficientemente soluble en agua. Esto permitiría: a) el estudio directo *in vivo*, mediante microscopia de fluorescencia, de los microtúbulos diana en los cultivos celulares, y b) disponer de una poderosa herramienta para estudiar el mecanismo molecular del ensamblaje de los microtúbulos inducido por estos taxanos, y para descubrir otras posibles dianas de las drogas dentro de la célula. Por otra parte, la observación directa, de una manera sencilla, de las células en las que el taxano ha ejercido su efecto permitiría desarrollar nuevos métodos de análisis y de diagnóstico relacionados con el tratamiento de pacientes con estas drogas. Además, las específicas propiedades fotoquímicas de los colorantes se podrían utilizar como ruta adicional en la destrucción de la célula cancerosa.

Algunos derivados fluorescentes de ambos taxanos se han descrito ya en la bibliografía. Sin embargo, el éxito de su aplicación a los anteriores objetivos ha sido hasta ahora muy limitado. Se ha descrito un derivado de paclitaxel que posee un grupo dansilo en la posición 7, unido a través de un grupo de β -alanina como espaciador (Kingston, *Pharmac. Ther.* **1991**, 52, 1), aunque la bioactividad de este compuesto está pendiente de demostración. También se ha dado cuenta de dos derivados fluorescentes de paclitaxel con grupos amino en su molécula: uno con un grupo *m*-amino en el benzoilo en posición 2 (Han y cols., *Mol. Biol. Cell* **1994**, 5, 284a), pero el derivado es menos activo que la droga de la que procede, y otro con un grupo *m*-dimetilamino en el benzoilo en posición 3' (Sengupta y cols., *Biochemistry*, **1995**, 34, 11889) cuya actividad biológica es similar a la de paclitaxel. La fluorescencia de estos dos aminoderivados es baja, aunque mayor que la del propio paclitaxel, y los valores de los coeficientes de extinción molar son pequeños. Esto hace que para su detección sea necesario utilizar altas concentraciones del derivado fluorescente. Cuando esto no es posible, dicha detección no se puede realizar. Asimismo se han descrito varios derivados fluorescentes de docetaxel con un grupo 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazo-4-ilo en la posición 7, o en la 3' de su derivado 3'-NH-desacilado, o bien con un grupo biotina en las posiciones 7, 10 o 3' (Dubois y cols., *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 10, 1357). En todos estos últimos compuestos los grupos fluorescentes están unidos al esqueleto de paclitaxel a través de un grupo 6-aminocaproico como espaciador. Sin embargo, sus actividades biológicas en células vivas parecen

discrepantes, y tiñen defectuosamente los microtúbulos celulares. Por último, existe comercialmente disponible (*Molecular Probes*, Holanda) un derivado de 3'-NH-desbenzoilpaclitaxel fluorescente (BODIPY-FL-Taxol, marca registrada) que posee un grupo de pirrometeno.BF₂ sustituido en el grupo NH en dicha posición 3', pero cuya solubilidad en agua es baja, lo que nuevamente limita considerablemente su empleo.

Una alternativa para visualizar el sistema de microtúbulos celulares consiste en utilizar las bien conocidas técnicas de inmunofluorescencia, por ejemplo mediante un anticuerpo fluorescente anti-tubulina. Estas técnicas, comercialmente disponibles, son indirectas, complejas y laboriosas, y permiten observar el sistema de microtúbulos sólo después de que éstos hayan interactuado con el taxano. Obviamente, estas técnicas de inmunofluorescencia no podrían substituir a las basadas en una molécula de paclitaxel o docetaxel fluorescente, porque en aquellas los microtúbulos interactúan con una proteína (IgG o sus fragmentos), y porque tanto la posición como la forma de actuación de dicha proteína y del taxano anticanceroso deben ser diferentes.

4. Descripción de la invención

4.1 La presente invención está basada en la obtención de derivados de los agentes anticancerosos paclitaxel y docetaxel que, además de conservar la bioactividad, emiten fluorescencia al ser excitados con luz visible. Esta propiedad permite, mediante microscopía de fluorescencia, detectar: a) las células que han reaccionado con la droga, y b) a qué parte de la célula se ha unido dicha droga. Los derivados de paclitaxel y de docetaxel cuya obtención y empleo aquí se patentan permiten además transportar al interior de la célula mayores concentraciones de la droga anticancerosa. Por otra parte, usando el mismo método de obtención, pueden unirse a la droga grupos moleculares que, al ser iluminados con luz visible, generen productos tóxicos para la célula.

4.2 Más concretamente, la invención describe la obtención y el empleo de derivados de paclitaxel o docetaxel que poseen un grupo cromóforo, unido al núcleo de la droga por la posición 7 a través de un espaciador. Es bien sabido que las modificaciones en el hidroxilo en esta posición 7 en la molécula de

paclitaxel no afectan apreciablemente a la actividad biológica de la droga. Los numerosos derivados aquí patentados se obtienen básicamente por un procedimiento químico que comprende dos pasos:

Primer paso: esterificación selectiva del grupo alcoholico en la posición 7 de la molécula de paclitaxel o docetaxel con ácidos carboxílicos que poseen en su molécula al menos un grupo amino primario libre. Esta reacción puede llevarse a cabo de diferentes modos, en general en varios pasos, siempre con aminoácidos con el grupo amino adecuadamente protegido, y con protección química adicional de los grupos del taxano que también puedan esterificarse. En la presente invención se ha usado preferentemente un procedimiento que comprende tres etapas, básicamente similares a las descritas por Mathew y cols en *J. Med. Chem.* 1992, 35, 145 para la esterificación en posición 7 de paclitaxel con L-alanina: 1) esterificación de los grupos alcoholicos en posiciones 7 y 2' de paclitaxel o docetaxel con un aminoácido con el grupo amino protegido (por ejemplo, con el grupo N-tertbutoxicarbonilo); 2) desprotección de ambos grupos amino en el diéster por reacción con ácido fórmico; y 3) hidrólisis acuosa selectiva del grupo éster en posición 2'. El aminoácido que se emplea para esterificar la posición 7 puede tener el grupo amino primario separado del carboxílico por una cadena de 1 a 18 carbonos, lineal o ramificada, o por un grupo fenileno con o sin sustituyentes alquílicos, y puede ser cualquiera de los α -L-aminoácidos naturales conocidos, como glicina, alanina, prolina, etc. sus D-isómeros, las mezclas racémicas correspondientes, o cualquier compuesto que posea simultáneamente en su molécula los grupos ácido carboxílico y amino primario.

Segundo paso: unión covalente de un cromóforo luminiscente (fluorescente o fosforescente) a dicho grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel obtenido en el primer paso, mediante reacción con una molécula de un colorante que posee un grupo con reacción selectiva con grupos amino. El grupo específico de la molécula de colorante que reacciona con el grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel puede ser cualquiera de los que se conocen por su alta afinidad reactiva frente a aminas primarias, tales como isocianatos, isotiocianatos, succinimidilésteres, ácidos carboxílicos o sus haluros y ácidos sulfónicos o sus haluros. El colorante con el anterior grupo reactivo de aminas primarias es

siempre un derivado de otro colorante, elegido entre los de las familias de los colorantes fluorescentes: xantenos (fluoresceína, Floxina, Eosina, Eritrosina, Rosa de Bengala, etc), tiacinas (tionina, Azul de Metileno, Azure A, Azure B, etc), rodaminas (Rodamina B, Rodamina 3B, Rodamina 19, Rodamina 6G, Rodamina 101, Rodamina 123, etc), cumarinas, porfirinas, aminonaftalenos, hidrocarburos policíclicos, polienos, y complejos de pirrometenos con trifluoruro de boro, que se unen al derivado de paclitaxel o docetaxel por el grupo amino libre existente en el sustituyente en la posición 7 de la droga.

Las únicas limitaciones de las anteriores reacciones de esterificación en posición 7 con un aminoácido y posterior sustitución del grupo amino del derivado de paclitaxel o docetaxel con un resto de colorante son:

- 1) las reacciones no deben alterar la estructura molecular del núcleo de paclitaxel o docetaxel, excepto en lo que se refiere a la esterificación de su posición 7, ni la del núcleo cromofórico del colorante;
- 2) las propiedades biológicas del derivado luminiscente de paclitaxel o docetaxel deben ser idénticas, o muy similares, a las del correspondiente taxano sin sustituir;
- 3) las propiedades de absorción y emisión de luz del cromóforo unido a la molécula de paclitaxel deben ser muy similares a las del colorante correspondiente en estado libre;
- 4) las propiedades de solubilidad en agua del derivado de paclitaxel o docetaxel finalmente obtenido deben ser tales que permitan su rápido paso a través de la membrana celular, si como su fácil disolución en el medio acuoso citoplasmático.

Una interesante aplicación de todos estos derivados es el empleo como fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica anticancerosa, especialmente los derivados que llevan incorporados cromóforos que poseen altos rendimientos cuánticos en la generación de la especie activa oxígeno molecular singlete. Esta aplicación está basada en la capacidad de paclitaxel y docetaxel para atravesar la membrana celular y unirse a la tubulina y a los microtúbulos del citoesqueleto. La célula así marcada puede ser irradiada con luz visible, que sería absorbida por el cromóforo unido al taxano, dando lugar a la generación de oxígeno singlete, un

fuerte oxidante que provocaría la destrucción, no sólo de la célula marcada, sino también de las que se encuentren próximas.

Otras aplicaciones

5

Algunos de los derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel descritos en esta patente poseen una propiedad excepcional: traspasan con facilidad la membrana celular externa y se unen de forma permanente a los microtúbulos del citoesqueleto celular conservando la intensa fluorescencia. Esto hace que sea
10 posible utilizar estos derivados específicos de paclitaxel y docetaxel en concentraciones muy bajas, por debajo de micromolares. Los inventores de esta patente han descubierto que en estas condiciones los microtúbulos del citoesqueleto celular y cualquier estructura celular conteniendo tubulinas (α y β 3 (cilios, flagelos, etc.) permanecen estructural y funcionalmente intactos, pese a
15 que son perfectamente observables a través de la intensa emisión de fluorescencia del derivado de paclitaxel o docetaxel que se encuentra unido específicamente a dichas estructuras

Esto hace posible que la célula o el organismo celular siga desarrollando
20 todas sus funciones biológicas sin alteración (crecimiento, reproducción, metabolismo, movilidad, etc.). Como, simultáneamente, la parte fluorescente del derivado mantiene la intensa luminosidad, este método permite observar y caracterizar la célula u organismo mediante técnicas de detección y visualización de la intensidad de la luz emitida.

25 En esta forma, los derivados fluorescentes citados de paclitaxel y docetaxel se pueden utilizar como nuevos colorantes específicos celulares de fluorescencia, de uso simple y directo, apropiados para la tinción de una gran variedad de células y organismos sin alterar su viabilidad.

A título ilustrativo, y sin que sea considerado como limitación al alcance de
30 la presente patente, se indica que se ha aplicado el derivado paclitaxel-alanina-fluoresceína en la tinción fluorescente de microtúbulos en células vivas, epiteliales y de tejido nervioso, así como en la tinción de organismos unicelulares vivos,

como el *Trypanosoma cruci*. Hay que destacar que actualmente no existe ningún método comercialmente disponible para la tinción fluorescente de los microtúbulos del citoesqueleto que permita observar las células u organismos *in vivo*, es decir, sin alterar sus funciones vitales.

5

Esta novedosa y excepcional propiedad de los derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel es el fundamento de las siguientes aplicaciones:

- 10 a) nuevos métodos de análisis y diagnóstico de enfermedades relacionadas con organismos celulares dotados de cilios y/o flagelos, fácilmente identificables a través de la observación y detección de sus sistemas característicos de microtúbulos y de su evolución temporal;
- 15 b) nuevos métodos, de análisis y diagnóstico de enfermedades en las que se producen alteraciones o destrucción del sistema y tejidos nerviosos, fácilmente identificables a través de la observación y detección de los sistemas característicos de microtúbulos;
- c) nuevos métodos de estudio, clasificación, observación y seguimiento de cualquier célula u organismo celular que contenga microtúbulos o tubulinas α y β .

20

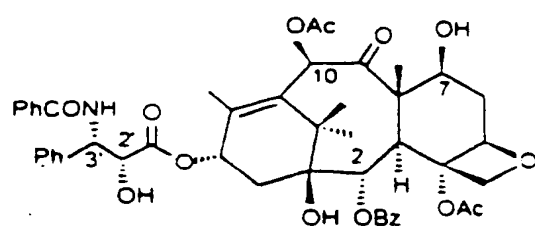
5. Descripción del esquema

El esquema muestra las estructuras moleculares de paclitaxel y docetaxel, las correspondientes moléculas conteniendo el espaciador $-\text{CO}-\text{R}^1-\text{NH}_2$ en la posición 7, y la estructura resultante de unir un colorante genérico, R^2 -colorante, por reacción con el grupo NH_2 del espaciador, así como los posibles grupos R^2 con reacción selectiva con grupos aminos primarios. La parte inferior del esquema muestra las estructuras de los tres derivados de paclitaxel que sirven de ejemplo en esta invención, con el cromóforo de una cumarina, una rodamina o fluoresceína en la molécula.

30

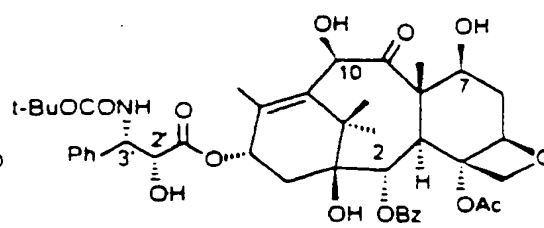
5

10



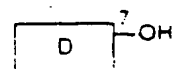
paclitaxel (taxol)

fórmula abreviada

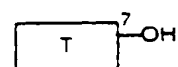


docetaxel (taxotere)

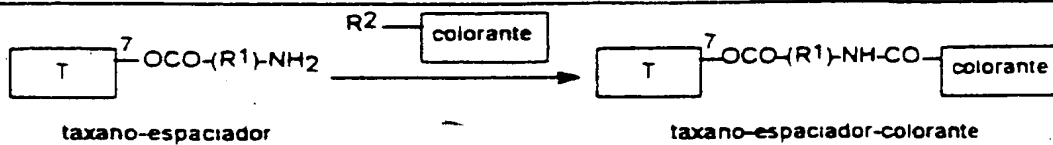
fórmula abreviada



fórmula abreviada de los taxanos paclitaxel y docetaxel .

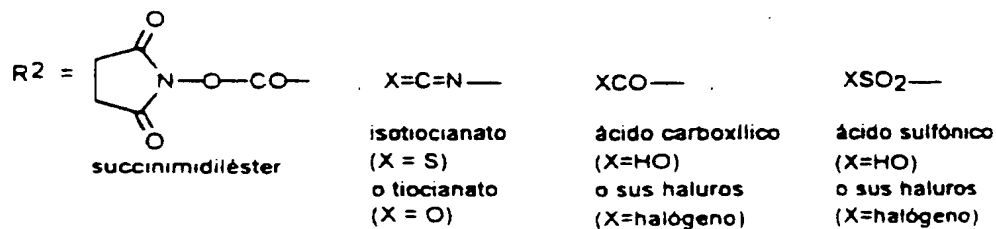


15



R1 = cadena carbonada lineal o ramificada, saturada o insaturada, de 1 a 18 carbonos, o grupo fenileno, libre o sustituido

20



25

fórmula abreviada de un resto de colorante

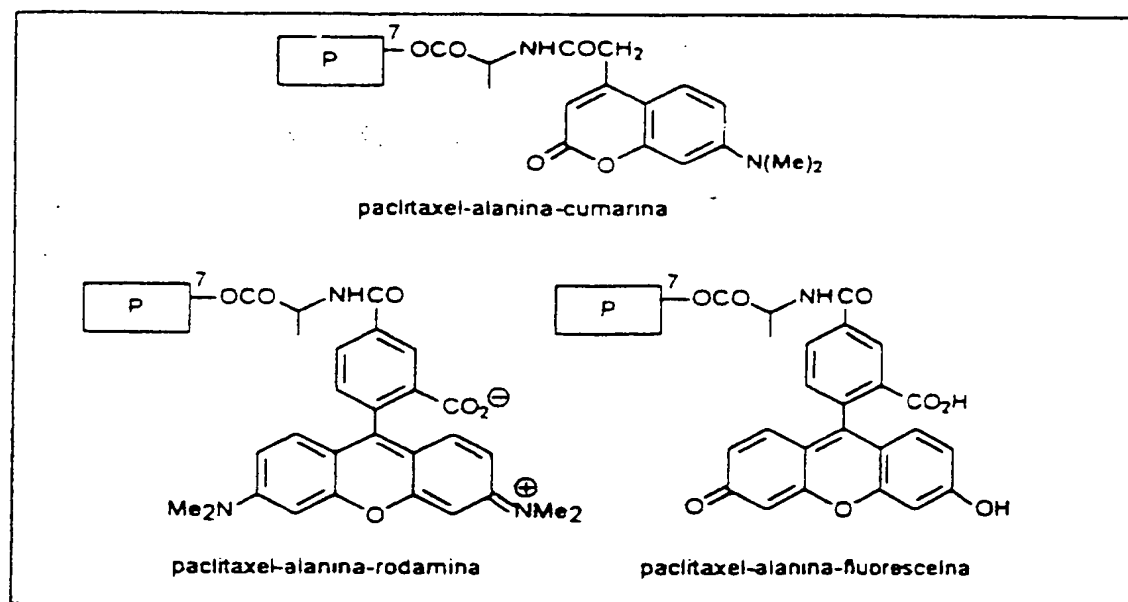


30

5

10

15



20

6. Ejemplos de realización

A título ilustrativo, y sin que sea considerado como limitación al alcance de la presente patente, a continuación se ilustran ejemplos de la unión química de tres colorantes, una cumarina, una rodamina y un xanteno, a la posición 7 de la molécula de paclitaxel, a través de un espaciador de L-alanina, así como un ejemplo práctico del empleo de uno de ellos, el derivado con el grupo fluoresceína, para la visualización de los microtúbulos celulares. Se han elegido estos tres fluoróforos porque muestran propiedades químicas, espectroscópicas y fotofísicas que son óptimas para los fines perseguidos en la presente invención: altos coeficientes de absorción a longitudes de onda alejadas de la absorción intrínseca de las proteínas, y próximas a los máximos de emisión de los láseres

comerciales disponibles, así como altos rendimientos en la emisión de fluorescencia, y valor elevado de la polarización de la emisión (anisotropía).

Ejemplo 1: *Obtención de paclitaxel-alanina-cumarina* (ver fórmula)

A una disolución de 7-(L-alanil)paclitaxel sin purificar (10 mg, 10.8 mmol)
5 (obtenido a partir de paclitaxel, con un rendimiento total del 70 %, siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Mathew y cols., *J. Med. Chem.* 1992, 35, 145), y trietilamina (15 μ L, 108 μ mol) en dioxano (1 mL) se añade otra de 7-dimetilaminocumarin-4-acetato de succinimidilo comercial (5.6 mg, 16.2 μ mol) en dioxano (0.5 mL). Tras agitar durante 24 horas a temperatura ambiente en la
10 oscuridad, el disolvente se elimina a vacío. El producto crudo paclitaxel-alanina-cumarina se purifica por cromatografía en capa fina preparativa (gel de sílice, acetato de etilo-diclorometano 1:1 como eluyente). Rendimiento: 9.5 mg (77 %). Punto de fusión: 182-185°C. Pureza por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) > 96 % (columna C-4, desde el 20 al 80 % de acetonitrilo en agua como
15 eluyente). Solubilidad en agua: 1 μ M. El producto se identifica por espectrometría de masas con bombardeo de átomo pesado (MS-FAB⁺) y por resonancia magnética nuclear de protón.

Ejemplo 2: *Obtención de paclitaxel-alanina-rodamina* (ver fórmula)

A una disolución de 7-(L-alanyl)paclitaxel sin purificar (10 mg, 10.8 mmol)
20 (obtenido como se dice antes) en una mezcla de dimetilformamida (1 mL) y tampón acuoso de pH 9 (carbonato/bicarbonato) (1 mL) se añade otra disolución de tetrametilrodamina-4'-carboxilato de succinimidilo comercial (8.6 mg, 16.2 mmol) en la misma mezcla de disolventes (1 mL). Tras agitar 2 horas, se separa el disolvente a vacío, y el producto crudo paclitaxel-alanina-rodamina se purifica
25 por cromatografía en capa fina preparativa (gel de sílice, acetato de etilo-diclorometano 1:4). Rendimiento: 7.9 mg (55 %). Pureza (por HPLC, condiciones como antes) > 92 %. El producto se identifica como antes.

Ejemplo 3: *Obtención de paclitaxel-alanina-fluoresceína* (ver fórmula)

Siguiendo las mismas condiciones, proporciones y método de purificación
30 que en el caso de la obtención del derivado paclitaxel-alanina-rodamina, se obtienen 8.0 mg (60 %) de producto. Punto de fusión > 300°C. Pureza (HPLC) > 92 %. Solubilidad en agua: 300 μ M (solubilidad de paclitaxel en el mismo medio:

5 μ M, según Nicolaou y cols., *Nature* 1993, 364, 464). El producto se identifica como antes.

Ejemplo 4: *Observación mediante microscopía de fluorescencia de los microtúbulos celulares con ayuda del colorante vital paclitaxel-alanina-*

5 *fluoresceína*

Células PtK2 se tratan con el derivado paclitaxel-alanina-fluoresceína (1 μ M), se lavan con disolución salina de tampón de fosfato, se montan sin fijación en una disolución de tampón de glicina 0.13 M de pH 8.6, cloruro sódico 0.20 M y glicerina al 70% (de acuerdo con lo descrito por Inés y cols., *Cancer Res.* 1994, 10 54, 75), y se observan con un microscopio de epi-fluorescencia. Los microtúbulos citoplásmicos son perfectamente visibles, así como los husos en las células en proceso de división. La calidad de la imagen es al menos semejante a la que se obtiene mediante procedimientos habituales de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-tubulina sobre células fijadas, distinguiéndose microtúbulos 15 individuales.

7. Reivindicaciones

1 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones. Estos derivados se caracterizan porque contienen en su molécula un grupo cromofórico luminiscente unido a la molécula original del taxano por la posición 7 a través de un espaciador.

2 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque el método para obtenerlos posee dos etapas consecutivas. En la primera etapa el grupo alcoholico en la posición 7 del taxano se esterifica selectivamente con un ácido carboxílico que tiene en su molécula un grupo amino primario. En la segunda etapa se hace reaccionar el aminoderivado del taxano, obtenido en la primera etapa, con un colorante que posee en su molécula un grupo con reacción selectiva con grupos aminos primarios. Los grupos amino primario y ácido carboxílico en el aminoácido están separados por una cadena de 1 a 18 carbonos, lineal o ramificada, o por un grupo fenileno, con o sin sustituyentes alquílicos. Dicho aminoácido puede ser cualquiera de los α -L-aminoácidos naturales conocidos, como glicina, alanina, prolina, etc, sus D-isómeros, las mezclas racémicas correspondientes, o cualquier compuesto que posea simultáneamente en su molécula los grupos ácido carboxílico y amino primario. El grupo con reacción selectiva con grupos aminos primarios puede ser isocianato, isotiocianato, succinimidilester, ácido carboxílico o haluro de ácido carboxílico, y ácido sulfónico o haluro de ácido sulfónico. El colorante con el anterior grupo reactivo de aminas primarias es siempre un derivado de otro colorante, elegido entre los de las familias de los colorantes xanténicos (fluoresceína, Floxina, Eosina, Eritrosina, Rosa de Bengala), las tiacinas (tionina, Azul de Metileno, Azure A, Azure B), las rodaminas (Rodamina B, Rodamina 3B, Rodamina 19, Rodamina 6G, Rodamina 101, Rodamina 123, Rojo Texas), cumarinas, porfirinas, aminonaftalenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno), polienos lineales o ramificados con un mínimo de tres dobles enlaces conjugados, y complejos de pirrometenos con trifluoruro de boro.

3 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque poseen bioactividad similar y más alta solubilidad en agua que el taxano del que derivan.

5 4 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque emiten fluorescencia o fosforescencia, o porque generan especies químicas citotóxicas al ser iluminados, cuando se encuentran unidos al sistema de microtúbulos de células benignas o malignas.

10 5 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque las propiedades electrónicas del grupo cromóforo existente en su molécula son adecuadas para nuevos métodos de análisis y nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades cancerosas, así como para la
15 terapia fotodinámica anticancerosa.

6 - Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, según la reivindicación 1, caracterizados porque las propiedades del grupo cromóforo existente en su
20 molécula son adecuadas para su aplicación, mediante técnicas ópticas de fluorescencia, en la observación, clasificación y seguimiento de células u organismos celulares vivos, sin alteración de sus funciones biológicas, mediante la tinción específica fluorescente de su citoesqueleto, flagelos, cilios, u otras estructuras que contienen, o están microtúbulos.

25

7. Derivados fluorescentes de paclitaxel y docetaxel con actividad antineoplásica, método para obtenerlos y sus aplicaciones, reivindicación 1, caracterizados porque sus propiedades químicas y fluorescentes son adecuadas para nuevos métodos de análisis y diagnóstico de enfermedades producidas por
30 microorganismos unicelulares, por alteraciones del tejido nervioso y, en general, por cualquier proceso físico, químico y/o biológico que pueda detectarse a través

14

de la observación específica del sistema de microtúbulos y de sus cambios y transformaciones.

5

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 96/00231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: C07D 305/14, C07D 407/12, A61K 49/00, 41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P,X	SOUTO et al: New fluorescent water-soluble taxol derivatives, Angewandte Chemie, International Edition, Vol. 34, n ^o 23/24, 5 January 1996, pages 2710-2712	1-7
A	MATHEW et al: Synthesis and evaluation of some water-soluble produgs and derivatives of taxol with anti-tumoractivity J. Med. Chem. Vol. 35, n ^o 1, 10 January 1992, pages 145-151, see page 146; example 10, abstract.	1-7
A	SENGUPTA et al: Interaction of a fluorescent Paclitaxel Analogue with Tubulin, Biochemistry, Vol. 34, n ^o 37, 1995, pag.11889-11894, see page 11890; fig.1; see abstract	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 February 1997 (25.02.97)

Date of mailing of the international search report

4 March 1997 (04.03.97)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES 96/00231

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ C07D 305/14, C07D 407/12, A61K 49/00, 41/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	SOUTO et al: New fluorescent water-soluble taxol derivatives, Angewandte Chemie, International Edition, Vol. 34, nº 23/24, 05.01.96, páginas 2710-2712	1-7
A	MATHEW et al: Synthesis and evaluation of some water-soluble produgs and derivatives of taxol with antitumoractivity J. Med. Chem. Vol. 35, nº 1, 10.01.92, páginas 145-151 Ver página 146; ejemplo 10; resumen	1-7
A	SENGUPTA et al: Interaction of a fluorescent Paclitaxel Analogue with Tubulin, Biochemistry, Vol. 34, nº 37, 1995, pág. 11889-11894, ver página 11890; fig. 1; ver resumen	1-7

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" documentos anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido la búsqueda internacional.
25 Febrero 1997 (25.02.97)

Fecha de expedición del Informe de Búsqueda Internacional
04 Marzo 1997 (04.03.97)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
nº de fax +34 1 3495304

Funcionario autorizado
MARTA OJANGUREN
nº de teléfono +34 1 3495474